



Apports de la TEP dans l'imagerie moléculaire des récepteurs sérotoninergiques 5-HT1A et 5-HT7

Laëtitia Lemoine

► To cite this version:

Laëtitia Lemoine. Apports de la TEP dans l'imagerie moléculaire des récepteurs sérotoninergiques 5-HT1A et 5-HT7. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10039 . tel-00863811

HAL Id: tel-00863811

<https://theses.hal.science/tel-00863811>

Submitted on 19 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole doctorale : Neurosciences et Cognition

Thèse de doctorat de l'Université Claude Bernard- Lyon 1

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue le 4 Mars 2011

Par Laëtitia Lemoine

**Apports de la TEP dans l'imagerie moléculaire
des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} et 5-HT₇**

Directeur de thèse : Pr. Luc Zimmer

JURY :

Pr. François Dauphin, Caen	Rapporteur
Dr. Yves Charnay, Genève	Rapporteur
Dr. Adrian Newman-Tancredi, Castres	Examineur
Dr. Cédric Bouteiller, Saint-Genis Pouilly	Examineur
Dr. Didier Le Bars, Lyon	Examineur
Dr. Thierry Billard, Lyon	Examineur
Pr. Luc Zimmer, Lyon	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur L. Collet

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

Liste des publications liées au travail de thèse

Publications internationales :

Lemoine L, Verdurand M, Vacher B, Blanc E, Le Bars D, Newman-Tancredi A, Zimmer L. [¹⁸F]F15599, an atypical 5-HT_{1A} receptor agonist, as a radioligand for PET neuroimaging. *European Journal of Nuclear Medicine & Molecular Imaging*, 2010, 37: 594-605.

Andries J, Lemoine L, Mouchel-Blaisot A, Tang S, Verdurand M, Le Bars D, Zimmer L, Billard T. Looking for a 5-HT₇ radiotracer for positron emission tomography. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20, 3730-3733.

Andries J, Lemoine L, Le Bars D, Zimmer L, Billard T. Synthesis and radiolabelling of potent 5-HT₇ receptor PET radiotracers. *Journal of Medicinal Chemistry*, soumis

Lemoine L, Andries J, Lancelot S, Le Bars D, Billard T, Zimmer L. Comparison of four radiolabelled antagonists for serotonin 5-HT₇ receptor neuroimaging: toward the first PET radiotracer. *Journal of Nuclear Medicine*, soumis

Lemoine L, Vacher B, Blanc E, Billard T, Newman-Tancredi A, Zimmer L. Radiosynthesis and preclinical evaluation of [¹⁸F]F13714 as a fluorinated 5-HT_{1A} receptor agonist radioligand for PET neuroimaging. *Journal of Nuclear Medicine*, en préparation

Communications écrites à des congrès internationaux

Lemoine L, Verdurand M, Zimmer L, Le Bars D, Vacher B, Newman-Tancredi A, Blanc E. Synthesis of radiolabelled F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist, its pharmacological and radiopharmacological evaluation. *Frontiers in Medicinal Chemistry*, Barcelona, Espagne 2009.

Lancelot S, Costes N, Lemoine L, Zimmer L. Development and evaluation of a digital atlas for PET neuroimaging in domestic cat (*Felis catus*). Annual Meeting of the Society of European Nuclear Medicine, Barcelona, Espagne, 2010.

Lemoine L, Andries J, Le Bars D, Lancelot S, Billard T, Zimmer L. Toward PET molecular imaging of 5-HT₇ receptors. Society of Nuclear Medicine Congress, Salk Lake City, 2010

Lemoine L, Andries J, Le Bars D, Zimmer L, Billard T. Synthesis, fluorine-18 labelling and evaluation of novel 5-HT₇ receptor antagonists. 16th European Symposium in Fluorine Chemistry. Ljubljana, Slovénie, 2010

Lemoine L, Andries J, Le Bars D, Lancelot S, Billard T, Zimmer L. Toward PET molecular imaging of 5-HT₇ receptors. 40rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2010.

Lemoine L, Verdurand M, Vacher B, Blanc E, Le Bars D, Newman-Tancredi A, Zimmer L. Radiopharmacological evaluation of F13714, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist. Society of Nuclear Medicine Congress, San Antonio, 2011

Communications écrites à des congrès nationaux

Tang S, Verdurand M, Billard T, Lemoine L, Zimmer L, Le Bars D. Synthesis of ¹⁸F-Radiolabelled 5-HT₇ Receptor Antagonist for PET Imaging. Journée scientifique du Cluster Chimie - Rhône Alpes "Molécules Bioactives", 2007

Tang S, Verdurand M, Billard T, Lemoine L, Zimmer L, Le Bars D. Synthesis of ¹⁸F-Radiolabelled 5-HT₇ Receptor Antagonist for PET Imaging. Journée scientifique - Région Rhône Alpes (Grenoble), 2007

Lemoine L, Verdurand M, Vacher B, Blanc E, Le Bars D, Newman-Tancredi A, Zimmer L. [¹⁸F]F15599, an atypical 5-HT_{1A} receptor agonist, as a radioligand for PET neuroimaging. 9^o Colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, 2009.

Lemoine L, Andries J, Le Bars D, Lancelot S, Billard T, Zimmer L. Vers l'imagerie moléculaire des récepteurs sérotoninergiques 5-HT₇. Journées Thématiques GDR «Imageries in vivo », Marseille, 2010.

Lemoine L, Andries J, Le Bars D, Zimmer L, Billard T. Synthesis, fluorine-18 labelling and evaluation of novel 5-HT₇ receptor antagonists. 8^{ème} Colloque Francophone de Chimie Organique du Fluor, Obernai, 2011.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Gérard Gimenez de m'avoir accueilli au sein du Cermep en qualité de directeur.

Un grand merci aussi à ADACAP (Advanced Accelerator Application) et plus particulièrement à Stefano Bueno d'avoir financé cette thèse.

Mes sincères remerciements vont ensuite aux personnes qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse. Un merci particulier à François Dauphin et Yves Charnay d'avoir accepté de lire et de juger cette thèse en qualité de rapporteur. Je tiens également à remercier Adrian Newman-Tancredi et Cédric Bouteiller pour leur présence en tant qu'examineur.

Je tiens ensuite tout particulièrement à remercier Luc Zimmer de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail de thèse. Cela fait pratiquement cinq ans maintenant que toute cette aventure à la fois scientifique et humaine a commencé. Merci pour ces discussions scientifiques et aussi ces moments de partages aux différents congrès auxquels nous avons participé. Je me rappelle de ces fous rires en compagnie de Didier, Thierry, ou encore Sylvain pour les menus Big-mac (autrement dit mes petites solutions radioactives).

Un grand merci à Didier Le Bars. Merci pour votre disponibilité pour les seringues en l'absence de Luc et merci aussi pour votre sympathie. Et oui je n'aurai jamais réussi en cinq ans à vous tutoyer.

Thierry que dire... Merci pour ta sympathie, ta bonne humeur et les bons fous rires que l'on a pu avoir pendant les manips TEP chats. J'espère avoir pu t'apporter autant en culture people grâce à closer, Oops, girl et j'en passe, que ce que tu as pu m'apporter scientifiquement et humainement.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble du personnel du CERMEP. Merci à Christine, Fabienne et Véro pour votre disponibilité et la préparation des salles pour les examens. Un merci particulier à l'équipe de la chimie : Christian Tourvielle, « Cricri », notre cyclotroniste sans qui le CERMEP ne tournerait plus rond et Fred pour ta sympathie et ta bonne humeur, ton rire communicatif et tes sabots orange.

Merci à Marion pour toutes ces synthèses que tu as pu effectuer pour moi, prévue ou rajouter en dernières minutes. Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Véro, merci pour ta bonne humeur, ta sympathie et le soin particuliers que tu apportes au bon traitement de nos « petits ratatons » et de nos chats. Un petit merci particulier à mes chats qui vont me manquer. Gimli, Gandalf, Achille, Icare, Hermès, Abys et Figaro. Vous êtes et avez été au top pour ceux qui ont malheureusement disparus... Bon à quelque reprise pas très coopératifs, mais je vous pardonne tellement cela a pu être rare.

Jean Christophe merci pour ces fous rire partagé avec Chouchou. Je retiendrai ta citation favorite : « On n'est pas bien payé mais qu'est ce qu'on se fend la gueule ».

Merci à Christian Pierre pour ta sympathie et ta disponibilité.

Merci à Mathieu d'avoir été là pendant le début de ma thèse et de m'avoir transmis ton savoir pour les différentes manips. Merci pour tous ces moments partagés en montagne, que ce soit dans les moments enneigés sur les pistes ou ensoleillés pendant les via ferrata.

Merci à toi Jamila, d'avoir toujours été là dès que j'en avais besoin. Pour ta bonne humeur, ta sympathie et ton amitié. En ayant le même caractère on se comprend beaucoup. Merci pour tes nombreux conseils, professionnels et personnels. Merci pour tout.

Chouchou....Que dire. Je t'ai réservé un accueil plutôt déroutant mais au final tout c'est bien passé. J'avoue tu as le droit de me détester car à cause de moi tout le monde t'appelle Chouchou, mais en tout cas, merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et ton implication dans les manips. Merci aussi pour tous ces fous rires avec Thierry. Bref merci d'avoir été un collègue si agréable pendant presque deux années au CERMEP... Par contre mes deux radiateurs y seront passés. À l'avenir tâche de t'asseoir sur une chaise pour parler !!! Oups je viens de me rendre compte que je n'avais même pas cité ton prénom du coup... Merci « Sylvain », pour les intimes.

Merci à toutes les personnes du CERMEP que j'ai pu côtoyer de près ou de loin. Franck, Nicolas, Jérôme, Sandrine, Rachid, Bruno, Céline, Carolina, Sophie, Caroline, Jean-Baptiste, François, Guillaume. Merci pour votre disponibilité et votre sympathie. Merci à toutes les personnes qui sont passées au CERMEP plus ou moins longtemps. Ma Framboisette, Nadia, Gérald, David, Flavien et j'en oublie certainement. Merci pour votre bonne humeur et votre sympathie.

Je tiens à remercier le personnel du laboratoire de Neuropharmacologie et particulièrement à Christianne Bardelli pour sa bonne humeur et sa disponibilité pour toutes les démarches administratives.

Une petite pensée à toutes les personnes qui m'ont donné envie de poursuivre mes études dans les sciences. Tous ces professeurs de biologie, au collège, au lycée ou encore à la fac de Reims et de Strasbourg.

Cette thèse n'aurait jamais pu être achevée sans le soutien inconditionnel de certaines personnes rencontrées sur Lyon:

Tout d'abord. Les copines de Promo ! L'année de M2 a été le début de l'aventure scientifique Lyonnaise mais aussi le début de très belles amitiés. Merci les filles, Koko, Krystel, Nono et Leslie d'avoir été là. On se comprend et ça fait du bien de vous avoir eu à mes cotés dans les moments de doutes. On se retrouve à la SFN. En 2011, 2012, 2013... A nous, San Diego, Washington et d'autres destinations pour de nouvelles aventures scientifiques et surtout amicales.

Un merci au membre d'Elixia. Et oui cette salle de sport m'aura permis de bien décompresser à la fin de ces journées. Elo, Audrey, Mu, Jeff, merci pour tous ces moments partagés... Merci à ma bande de nazes du club ou encore appelé les « ETOILES ». Rami, Manu, Pat, Zarouk et mes deux Xav, ma blonde, sans vous et ces soirées décompressions ça aurait été tout de suite moins simple.

Spéciale dédicace à mon Boumboumbourg National et nos apéros rosés quai... Mon Jérem merci pour tout...

Merci Aurèl...Tu es toujours là dès que j'ai besoin... Rien à dire de plus à part que je t'adore et que je sais que tu seras toujours là pour moi et inversement. Une très belle amitié « Rhumesque » nous lie et c'est devenu bien plus que ça !!

Merci ensuite particulier à ma petite bande de salseiro... Et oui la passion de la danse et particulièrement de la salsa nous a rapproché, et nous avons tellement partagé... Merci d'avoir été là dans mes moments de doute... Maryse avec un calme à tout épreuve pour supporter mes sautes d'humeur et qui a su être là pendant les durs moments de la rédaction et la relecture mais aussi merci pour tous ces moments partagés et cette complicité. Choup, ma partenaire de bacchata, merci d'avoir été là aussi, pour nos souvenirs de soirées électro entre autres. Titi, comme tu dis on s'adore autant qu'on se déteste mais je ne regrette pas de t'avoir rencontré et merci d'avoir été là et d'être toujours à mes cotés à ta manière. Mon p'tit Lu, merci d'avoir été là durant la dernière année de ma thèse et de ma vie, nos chemins se sont séparés mais tu restes un réel maillon dans cette réussite. Ma Flo, même si tu es partie tu es resté un soutien

inconditionnel pour moi... Merci pour ces mails et appels téléphoniques quand j'avais un petit coup de mou. Je vous adore tous Maryse, Choup, Titi, Ludo, Florence, merci d'avoir été là, de m'avoir supporté pendant mes moments de doute...

Laure, Qu'est ce que j'ai pu rire quand Luc est rentré dans le labo alors que tu chantais a tue tête... !!! Ces quelques mois où tu as été au cermep ont vraiment été très agréables pour moi et je tiens à te remercier car une belle amitié est née à l'issue de cette rencontre.

Pour finir Mes Deux amoureux... Laulau et Juju... Que dire... Merci d'être là, de me faire partager tant de choses avec vous. J'ai un petit peu l'impression de faire partie de votre famille. Et oui la Vendée a été ma deuxième maison l'année dernière. Vous êtes justes formidables... (Oui oui et je pèse mes mots !!).

Mes derniers remerciements vont aux personnes qui sont auprès de moi depuis des années :

Mes amis... Eux... Ma petite bande qui supporte mon sale caractère depuis 11 ans maintenant. Merci pour votre soutien, et votre amitié sincère. Merci d'avoir toujours été là pour moi... Je ne peux pas dire grand chose de plus, vous savez déjà tout. Je souhaite juste à tout le monde de pouvoir découvrir le sens du mot 'amitié' tel que je le connais avec vous. Ju, LuK, Bri², Flo, Flo', Elsa, Benoit, Adeline : Sachez juste que je vous adore.

Enfin un merci, un immense merci aux personnes les plus importante :

MA FAMILLE

Merci à toute la famille que je ne peux citer, d'avoir été là et de m'avoir encouragé jusqu'au dernier moment.

Ma grande sœur, Alexandra, toujours, là dans les bons comme les mauvais moments. Je dois vous remercier vous deux, Mickaël et toi de m'avoir donné trois petites merveilles... Laury, Théo, Lucas, je dois dire que de vous avoir au téléphone ou de vous voir remonte le moral en tout état de cause... Je vous aime.

Papa et Maman... Que dire... Sans vous, sans votre éducation, sans votre amour, je n'en serais jamais arrivé là. Merci pour tout cela, merci d'être là, et de l'être toujours dès que j'en ressens le besoin. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir donné les moyens d'en arriver là, arriver à faire le métier que je voulais faire déjà toute petite. Je pourrai écrire des pages et des pages de merci pour vous, tellement je vous admire et vous aime.

A toutes les personnes que j'aime disparues trop tôt ...

Liste des abréviations

5-CT :	5-carboxamidotryptamine
5-HT :	5-hydroxytryptamine
5-HTT :	5-HT transporteur
5-HIAA :	acide 5-hydroxy-indol-acétique
ACTH :	adrénocorticotrophine
ADN _c :	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMP _c :	adénosine monophosphate cyclique
ARN _m :	acide ribonucléique messenger
AMIDE :	medical imaging analysis data examen
BHE :	barrière hémato encephalique
CA :	corne d'Ammon
CG :	cortex cingulaire
CN :	noyau caudé
CERMEP :	centre exploration et de recherche multimodale et pluridisciplinaire
FST :	forced swimming test
DG :	gyrus denté
DMSO :	Dyméthylsulfoxyde
DOI :	2,5-diméthoxy-4-iodoamphétamine
DAG :	diacylglycérol
GDP :	guanosine diphosphate
GTP :	guanosine triphosphate
Gi :	G inhibitrice

Gs :	G stimulatrice
HPLC :	chromatographie liquide à haute performance
HRP :	horse radish peroxydase
IRM :	imagerie par resonance magnétique
IP3 :	inositol triphosphate
ISRS :	inhibiteur selectif de la recapture de la sérotonine
IC50 :	concentration inhibitrice à 50%
Ki :	constante d'inhibition
Kd :	constante de dissociation d'un ligand
KO :	knock out
LCR :	liquide céphalorachidien
LSD :	diéthylamide de l'acide lysergique
MAO-A :	monoamine oxydase A
MAO-B :	monoamine oxydase B
MEG :	magnétoencephalographie
NRD :	noyau du raphé dorsal
NRM :	noyau du raphé médian
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
PGp :	glycoprotéine P
PLC :	phospholipase C
PCR :	polymerase chain reaction
PHA-L:	phasoleus vulgaris-leucoagglutinin
PKC :	proteine kinase C
REM :	rapid eye movement

RCPG :	récepteur couplé aux protéines G
SERT :	transporteur de la serotonine
SNC :	système nerveux central
S :	septum
TEP :	Tomographie par émission de positons
TPH :	Tryptophane hydroxylase
TST :	Tail suspension test
8-OHDPAT :	tertraline 8-hydroxy-2- (Di-n-propylamino)
[¹⁸ F]MPPF :	2'-methoxyphenyl-(N-2'-pyridinyl)- <i>p</i> -fluoro-benzamidoethyipiperazine
[¹¹ C]WAY100635 :	<i>N</i> -[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]- <i>N</i> -(2-pyridyl)cyclohexanecarboxamide
[¹¹ C]DWAY :	Desméthyl-WAY-100635
[¹⁸ F]FPWAY :	4-fluoranyl- <i>N</i> -[2-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]ethyl]- <i>N</i> -pyrimidin-2-ylbenzamide
[¹⁸ F]FCWAY :	4-Fluoro- <i>N</i> -2-[4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]ethyl]- <i>N</i> -(2-pyridyl)cyclohexanecarboxamide
[¹¹ C]CPC222 :	<i>N</i> -[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]- <i>N</i> -(2-pyridinyl)-2-bicyclo[2,2,2]octane carboxamide
[¹¹ C](R)R-WAY :	(<i>R</i>)-2,3,4,5,6,7-Hexahydro-1-[4-[1-[4-(2-[¹¹ C]methoxyphenyl)piperazinyl]]-2-phenylbutyryl]-1 <i>H</i> -azepine
[¹⁸ F]MeFWAY :	<i>N</i> -{2-[4-(2-Methoxyphenyl)piperazinyl]ethyl}- <i>N</i> -(2-pyridyl)- <i>N</i> -(4-[¹⁸ F]-fluorométhylcyclohexane)carboxamide
[¹¹ C]Nad-299 :	([<i>R</i>]-3- <i>N,N</i> -dicyclobutylamino-8- fluoro-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -1-benzopyran-5-carboxamide)
[¹¹ C]LY274601 :	<i>R</i> -(+)-8-thiométhyl-2-(di- <i>n</i> -propyl-amino)tetralin]
[¹¹ C]MPT :	[<i>O</i> -méthyl- ¹¹ C]2-{4-[4-(7-Methoxynaphthalen-1-yl)piperazin-1-yl]butyl}-4-méthyl-2 <i>H</i> -[1,2,4]triazine-3,5-dione

[¹¹ C]MMT :	2-{4-[4-(3-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-butyl}-4-méthyl-2H-[1,2,4]triazine-3,5-dione
[¹¹ C]MPT :	2-{4-[4-(7-Methoxynaphthalen-1-yl)piperazin-1-yl]butyl}-4-méthyl-2H-[1,2,4]triazine-3,5-dione
S14506 :	1-[-(4-fluorobenzoylamino)ethyl]-4-(7-methoxynaphthyl)piperazine hydrochloride
[¹¹ C]methoxyphényl-thiochromane :	8{{3-[4-(2-[¹¹ C]methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-2-hydroxypropyl}oxy)thiochroman
[¹¹ C]DR4446 :	1-méthyl-2a-[4-(4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridin-5-yl)butyl]-2a,3,4,5-tetrahydro-1H-benz[cd]indole-2-one
SB656104 :	6-((R)-2-{2-[4-(4-Chloro-phenoxy)-piperidin-1-yl]-ethyl}-pyrrolidine-1-sulphonyl)-1H-indole hydrochloride
SB269970 :	(2R)-1-[(3-Hydroxyphenyl)sulfonyl]-2-(2-(4-méthyl-1-piperidinyl)ethyl)pyrrolidine
SB258719 :	3-Méthyl-N-[(1R)-1-méthyl-3-(4-méthyl-1-piperidinyl)propyl]-N-méthylbenzenesulfonamide hydrochloride
LP211 :	N-(4-cyanophenylméthyl)-4-(2-diphenyl)-1-piperazinehexanamide

Sommaire

Rappels bibliographiques 13

I) La neurotransmission sérotoninergique	14
1) La sérotonine	14
a) Biosynthèse de la 5-HT	15
b) Stockage et relargage de la 5-HT	17
c) Transport et catabolisme de la 5-HT	17
2) Anatomie du système sérotoninergique cérébral	18
a) Distribution des corps cellulaires 5-HT	18
b) Les différentes projections	20
II) Les récepteurs sérotoninergiques :	24
1) Les récepteurs ionotropes	24
2) Les récepteurs métabotropes	25
3) Les différentes sous classes de récepteurs sérotoninergiques	26
a) 5-HT ₁	26
b) 5-HT ₂	26
c) 5-HT ₃	27
d) 5-HT ₄	27
e) 5-HT ₅	27
f) 5-HT ₆	28
g) 5-HT ₇	28
4) Les récepteurs 5-HT _{1A}	28
a) Structure moléculaire du récepteur 5-HT _{1A}	29
b) Distribution régionale et localisation subcellulaire du récepteur	
5-HT _{1A}	30

c) Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques de récepteur	
5-HT _{1A}	32
5) Les récepteurs 5-HT ₇	34
a) Structure du récepteur 5-HT ₇	35
b) Distribution cellulaire du récepteur 5-HT ₇	36
c) Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques de récepteur	
5-HT _{1A}	39
6) Les récepteurs 5-HT _{1A} et 5-HT ₇ comme cibles thérapeutiques	41
a) Les récepteurs 5-HT _{1A}	41
b) Les récepteurs 5-HT ₇	44
III) Les biomarqueurs TEP	48
1) Définitions des biomarqueurs	48
2) Les biomarqueurs en neurologie et en psychiatrie	49
IV) L'imagerie TEP	50
1) Principe général.....	50
2) Principes physiques et instrumentaux	50
3) Les radiotraceurs TEP	52
a) Les différents types d'émetteurs de positons.....	52
b) Production du radiotraceur	52
c) Les prérequis d'un radiopharmaceutique	54
V) L'imagerie TEP des récepteurs sérotoninergiques 5-HT _{1A}	56
VI) L'imagerie TEP des récepteurs sérotoninergiques 5-HT ₇	67
Les objectifs de la thèse	68

Matériels et méthodes 69

Partie 1 : Protocoles liés aux radiotraceurs 5-HT_{1A} 70

I) Radiomarquage du F15599, du F13714 et du MPPF 70

II) Les animaux et les procédures animales 72

1) Les animaux 72

a) Rats 72

b) Chats 72

2) Les procédures animales 72

a) Anesthésie 72

b) Cathétérisation 73

III) Traitements pharmacologiques 74

a) WAY100635 74

b) 8-OHDPAT 74

c) ciclosporine 74

d) F15599 74

e) F13714 74

f) Gpp(NH)p 75

IV) Techniques utilisées 75

1) Autoradiographie in vitro chez le rat et chez le chat 75

a) Principe et instrumentation 75

b) Préparation des lames pour l'autoradiographie 76

c) Marquage des lames au [18F]F15599 et [18F]F13714 76

2) Autoradiographie ex vivo chez le rat 78

a) Définition 78

b) Préparation de l'animal	78
c) Prélèvement du cerveau et préparation des lames	78
3) Imagerie fonctionnelle microTEP et TEP	79
a) Déroulement des examens microTEP ex vivo chez le rat.....	79
b) Déroulement des examens microTEP ex vivo chez le rat	79
c) Déroulement des examens TEP chez le chat	80
4) Imagerie anatomique microIRM et IRM	80
a) Déroulement des examens microIRM in vivo chez le rat	80
b) Déroulement de l'examen IRM chez le chat.....	81
<u>Partie II : Protocoles liés aux radiotraceurs 5-HT₇.....</u>	82
I) Radiomarquage des précurseurs 5-HT ₇	82
II) Les animaux et les procédures animales	83
III) Traitements pharmacologiques	83
IV) Techniques utilisées	83
1) Autoradiographie in vitro chez le rat	83
2) Imagerie microTEP et TEP	84
a) Déroulement des examens microTEP ex vivo chez le rat.....	84
b) Déroulement des examens TEP in vivo chez le chat	84
Résultats	85
<u>Évaluation radiopharmacologique de l'agoniste 5-HT_{1A} : le [¹⁸F]F15599</u>	86
I) Expériences de compétition avec le [¹⁸ F]MPPF	86
1) Compétition in vitro	86
2) Compétition ex vivo	89
II) Radiomarquage du F15599 au fluor 18 et caractérisation	90

1) Réalisation du radiomarquage du F15599	90
2) Études de distribution in vitro du [18F]F15599.....	92
3) Études des compétition in vitro avec le [18F]F15599	94
4) Métabolites cérébraux chez le rat	97
5) Distribution ex vivo chez le rat	98
6) Étude de la distribution du [18F]F15599 in vivo chez le rat et chez le chat.....	99
<u>Évaluation radiopharmacologique de l'agoniste 5-HT_{1A} : le [18F]F13714.....</u>	101
I) Expériences de compétition avec le [18F]MPPF	101
1) Vérification du caractère 5-HT _{1A} du F13714 par compétition in vitro.....	101
2) Compétition ex vivo.....	104
II) Radiomarquage du F13714 au Fluor 18 et caractérisation	105
1) Réalisation du radiomarquage du F13714	105
2) Étude de la distribution in vitro du [18F]F13714	107
3) Études in vitro du [18F]F13714.....	108
4) Études de la compétition ex vivo	111
5) Études des métabolites radioactifs.....	112
6) Distribution ex vivo chez le rat	113
7) Imagerie in vivo chez le chat	114
<u>Évaluation radiopharmacologique des récepteurs 5-HT₇ :.....</u>	117
1) Synthèse et radiomarquage des molécules 5-HT ₇	117
2) Pharmacologie in vitro.....	119
3) Distribution in vitro des antagonistes radiomarqués chez le rat.....	120
4) Compétition in vitro chez le rat	121

5) Compétition par autoradiographie ex vivo chez le rat et microTEP	
ex vivo	123
a) Études ex vivo de l'effet de la ciclosporine chez le rat	123
b) Compétition ex vivo microTEP chez le rat	124
6) Imagerie in vivo chez le chat des 4 radioligands	125
a) Famille FPMP.....	125
b) Famille FP3	127
7) Étude des métabolites cérébraux chez le chat	132
Discussion	133
Apports des agonistes dans l'imagerie des récepteurs 5-HT _{1A}	134
Apports des agonistes dans l'imagerie des récepteurs 5-HT ₇	148
Bibliographie.....	155

Rappels Bibliographiques

I) LA NEUROTRANSMISSION SEROTONINERGIQUE

1) La Sérotonine

La sérotonine (Figure 1) est une amine biogène découverte en 1935 par l'Italien Vittorio Erspamer. Elle a tout d'abord été appelée entéramine, en raison de sa présence dans les cellules entérochromaffines de l'intestin. Environ 80% de la sérotonine du corps humain se situe dans les cellules intestinales. Les 20% restants sont localisés sur les neurones sérotoninergiques du système nerveux central où elle joue plusieurs rôles. En effet, il a été montré que la sérotonine était impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques, comme la thermorégulation, le sommeil, le contrôle de la nociception et de l'appétit, le développement cérébral, mais aussi dans certains comportements tels que l'agressivité, l'anorexie ou encore le comportement sexuel (Jones and Blackburn, 2002). De plus, elle est impliquée dans la physiopathologie de désordres neuropsychiatriques majeurs comme la dépression, la schizophrénie ou encore la maladie d'Alzheimer (Hoyer et al., 2002 ; Jones and Blackburn, 2002 ; Lucki, 1998 pour revue).

Au niveau périphérique, la sérotonine, sécrétée par les cellules entérochromaffines, est transportée par les plaquettes sanguines où elle a un rôle sur la contraction des cellules des muscles lisses. Elle a aussi un effet sur l'innervation des vaisseaux sanguins cérébraux. La libération locale de sérotonine a des effets vasoconstricteurs. Enfin, la sérotonine est indispensable au péristaltisme intestinal.

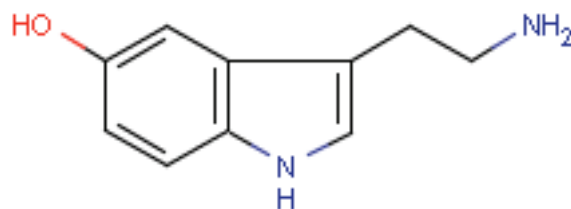


Figure 1 : Structure chimique de la sérotonine ou 5-HT.

a) Biosynthèse de la sérotonine

La sérotonine ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (BHE), comme la plupart des amines neuromédiatrices. Elle est synthétisée à partir du L-tryptophane, un acide aminé apporté essentiellement par la nourriture (prise journalière de 0,5 à 1g) et qui, sous sa forme plasmatique libre, c'est-à-dire non liée à l'albumine, pénètre la BHE (Moir, 1971). Certains facteurs font varier la concentration en L-tryptophane mais aussi son passage de la BHE. En effet, le L-tryptophane est en compétition avec différents acides aminés comme la leucine ou la phénylalanine qui ont le même transporteur au niveau de la BHE. De plus, la concentration de cortisol, qui est souvent augmentée chez les patients dépressifs (Dinan and Scott, 1996), diminue les concentrations de L-tryptophane libre et L-tyrosine libre dans le plasma, alors que l'insuline diminue la quantité des acides aminés autres que le tryptophane. La concentration de sérotonine synthétisée dépend donc de facteurs qui influencent la quantité plasmatique de L-tryptophane libre capable de pénétrer la BHE (Fernstrom et al., 1976).

La synthèse de la sérotonine se fait en deux étapes (Figure 2). La première étape est l'hydroxylation du L-tryptophane par la tryptophane hydroxylase (TPH), en présence d'oxygène et de tétrahydrobioptérine, pour obtenir la 5-hydroxytryptophane. Cette étape est limitante et la tryptophane hydroxylase peut être inhibée par la p-CPA ou le p-EPA (Tohyama et al., 2002 ; Zimmer et al., 2002a). Des études d'invalidations du gène de la TPH ont montré l'existence de deux formes, la TPH-1 et la TPH-2 (Walther and Bader, 2003). La TPH-1 est impliquée dans la synthèse de sérotonine non-neuronale, alors que la TPH-2 se situe essentiellement au niveau cérébral (Walther and Bader, 2003).

La deuxième étape de la synthèse de la sérotonine est la décarboxylation acétique de la 5-hydroxytryptophane par la 5-hydroxytryptophane décarboxylase (décarboxylase des acides aminés aromatiques) en présence de pyridoxal phosphate et aboutissant à la formation de 5-hydroxytryptamine ou sérotonine (5-HT). Cette synthèse est identique dans l'intestin. Au niveau plaquettaire, il n'y a pas de synthèse de 5-HT, mais uniquement décarboxylation dans le plasma, à partir du 5-hydroxytryptophane hépatique ou bien capture de la 5-HT par les plaquettes.

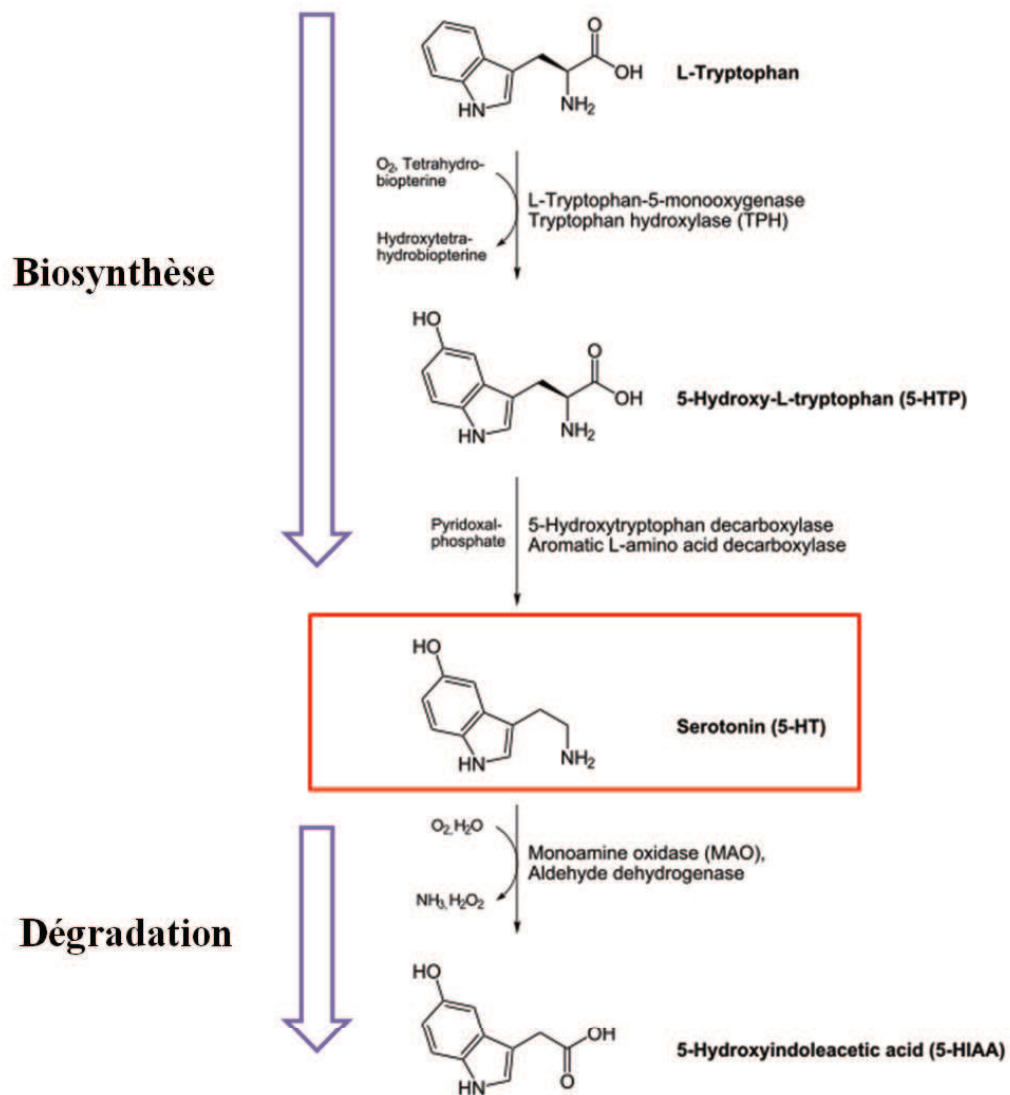


Figure 2 : Synthèse et métabolisme de la sérotonine.

b) Stockage et relargage de la sérotonine

Dans un premier temps, des études autoradiographiques avec le précurseur de la sérotonine marqué au tritium ont permis de localiser les sites de stockage et de métabolisme de la sérotonine dans le foie, l'intestin, la thyroïde ou dans le cœur de la souris (Gershon and Ross, 1966). Des études ultérieures ont permis de déterminer que le stockage de la 5-HT se faisait dans des vésicules situées dans les terminaisons nerveuses grâce au transporteur vésiculaire spécifique des monoamines, le VMAT ou Vesicular Monoamine Transporter (Njus et al., 1986). Trois types de vésicules de stockage ont été identifiés (Kelly, 1993 pour revue). Le premier type est constitué d'un pool de vésicules immédiatement prêtes à fusionner avec la membrane neuronale après l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Le deuxième groupe est constitué de vésicules situées près des sites d'exocytose et rapidement fonctionnelles. Enfin, le troisième groupe se trouve distant du site d'exocytose et n'est fonctionnel pour la fusion qu'après un certain délai (Boehm and Kubista, 2002). La libération de la sérotonine est déclenchée par un potentiel d'action, créant une dépolarisation nerveuse et entraînant l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée d'ions Ca^{2+} va entraîner la fusion des vésicules à la membrane neuronale présynaptique et, ainsi, provoquer l'exocytose du neuromédiateur monoaminergique dans la fente synaptique (Elhwuegi, 2004 pour revue). La sérotonine peut aussi être libérée dans les dendrites de manière calcium-dépendante (Bagdy and Harsing, 1995).

c) Transport et catabolisme de la sérotonine

La sérotonine ainsi libérée peut aller se fixer sur des récepteurs, à la fois postsynaptiques ou présynaptiques. Lorsque la 5-HT se fixe sur les récepteurs présynaptiques, un rétrocontrôle de la sérotonine libérée va avoir lieu et la concentration en 5-HT de la fente synaptique va être modulée. Ces récepteurs présynaptiques sont appelés autorécepteurs somatodendritiques car ils sont situés sur les dendrites du neurone 5-HT (Starke et al., 1977).

Les récepteurs de la sérotonine peuvent être distingués en deux types : les récepteurs à canaux ioniques, dit ionotropes, et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), dit métabotropes. La liaison de la 5-HT sur un récepteur

ionotrope va permettre la transformation d'un signal chimique (le neurotransmetteur) en un signal électrique (changement de la perméabilité membranaire). Les récepteurs métabotropiques, quant à eux, changent leurs conformations au contact du neurotransmetteur et activent une cascade d'événements intracellulaires. La 5-HT peut aussi être recaptée par le transporteur spécifique de la 5-HT (SERT ou 5-HTT). Le SERT est un membre de la famille des transporteurs Na^+/Cl^- dépendants (Mochizuki et al., 2005). Le SERT est responsable du transport actif de la sérotonine dans les neurones, mais aussi dans les cellules entérochromaffines, les plaquettes et les autres cellules. Sa localisation est à la fois périphérique et cérébrale, sur la membrane présynaptique et sur les arborisations dendritiques à proximité des somas contenant la 5-HT dans le mésencéphale ainsi que dans les noyaux du Raphé (Murphy et al., 2004).

La sérotonine, une fois recaptée, est catabolisée grâce à des enzymes mitochondriales. Il s'agit de la monoamine oxydase de type A (MAO-A) qui désamine la 5-HT pour former le 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA ; Figure 2). Il existe aussi une MAO-B qui est présente dans les terminaisons des neurones 5-HT mais qui agit sur d'autres monoamines ou lorsque la concentration en 5-HT est très élevée dans le cytoplasme des cellules. Le 5-HIAA se retrouve dans le liquide céphalorachidien et l'urine à un niveau détectable analytiquement. Ainsi, son dosage urinaire était considéré, il y a quelques années, comme le reflet de « l'activité sérotoninergique » (Bucht et al., 1981 ; Winblad et al., 1979 ; Arai, 1984). Cette notion a été abandonnée au profit des approches centrales non invasives comme l'imagerie (et que nous allons décrire plus loin).

2) Anatomie du système sérotoninergique cérébral

a) Distribution des corps cellulaires 5-HT

Dans les années 1960, les neurobiologistes Dahlström et Fuxe ont été les premiers à utiliser la technique d'histofluorescence développée par Falck-Hillarp (Falck and Torp, 1962) pour observer les somas (ou corps cellulaires) sérotoninergiques (Dahlström and Fuxe, 1964). Ils ont rapporté que la majorité des corps cellulaires 5-

HT serait localisée dans les noyaux du raphé (raphé nucleus) (Taber et al., 1960). Ainsi, il y a près de 500 000 neurones sérotoninergiques dans ces noyaux (Hornung, 2003). Plus récemment, il a également été rapporté qu'un plus faible nombre de corps cellulaires se trouve dans les formations réticulaires ventrales et dorsales (Descarries et al., 1982 ; Törk, 1990).

Dahlström et Fuxe ont décrit neuf groupes contenant les corps cellulaires 5-HT, numérotés de B1 à B9 (Figure 3) et correspondant pour la plupart à des noyaux du raphé (Hensler, 2006 pour revue ; Steinbush, 1981). Ainsi, les groupes B1-B4 sont situés dans le pons moyen de la médulla caudale et contiennent un petit nombre de cellules 5-HT. Le groupe B7 regroupe les régions contenant le plus de cellules sérotoninergiques. Il coorespond au noyau du raphé dorsal auquel on associe un petit groupe, nommé B6, qui est son extension caudale. Le noyau du raphé médian est le groupe B8. Le groupe B9 regroupe une partie du tegment ventrolatéral du pons et du mésencéphale, formant une extension latérale du noyau du raphé médian.

Structures contenant les cellules 5-HT	Groupes B
noyau du raphé pallidus	B1
noyau du raphé obscurus	B2
partie dorsolatérale du raphé obscurus	B4
noyau du raphé magnus	B3
medulla ventrolatérale rostrale	B3
noyau réticulaire paragigantocellulaire latéral	B3
medulla ventrolatérale caudale	B1
partie caudale du noyau du raphé médian	B5
partie rostrale du noyau du raphé médian	B8
partie caudale du noyau du raphé dorsal	B6
partie rostrale principale du noyau du raphé dorsal	B7
noyau caudal linéaire	B8
noyau pontis oralis	B8/B9
région supralemniscle	B9

Figure 3 : Désignations anatomiques des groupes de cellules 5-HT dans le noyau du raphé et dans la formation réticulaire du tronc cérébral ainsi que la classification correspondante dans les groupes B, en accord avec Dahlström et Fuxe (d'après Törk, 1990).

Ces premières observations de Dahlström et Fuxe ont été complétées par d'autres approches neuroanatomiques permettant une vision très précise de l'innervation sérotoninergique cérébrale. Ainsi, des techniques de manipulations pharmacologiques, par destruction des neurones monoaminergiques en utilisant la 5-6 dihydroxytryptamine, la 5-7 dihydroxytryptamine ou encore la p-chloroamphétamine ont été utilisées (Daly et al., 1974 ; Björklund et al., 1974). D'autres études ont utilisé des approches autoradiographiques avec de la 5-HT tritiée ou de la réserpine tritiée (Wicklund and Björklund, 1980 ; Descarries et al., 1982). Les techniques d'immunohistochimie utilisant des anticorps dirigés contre la sérotonine, la tryptophane hydroxylase ou la décarboxylase des acides aminés aromatiques comme marqueurs de la sérotonine ont également été utilisées (Köhler and Steinbusch, 1982 ; Bendotti et al., 1990). Ces techniques ont permis de confirmer que la grande majorité des corps cellulaires 5-HT se trouvent dans les noyaux du raphé avec 50% des neurones à 5-HT chez le rat (Wicklund and Björklund, 1980 ; Descarries et al., 1982). Cette organisation sérotoninergique avec la majorité des corps cellulaires 5-HT dans le noyau du raphé dorsal et une plus faible quantité sur le tronc cérébral a également été mise en évidence chez d'autres espèces animales comme le chat (Wicklund et al., 1981), le cochon d'Inde (Warembourg and Poulain, 1985), le lapin (Bjarkam et al., 1997), la souris (Ishimura et al., 1988), le chien (Kojima, 1983), le singe (Azmitia and Gannon, 1986 pour revue) et, enfin, chez l'homme (Baker et al., 1990).

Il est à noter que des corps cellulaires 5-HT peuvent être trouvés en dehors des noyaux du raphé : dans la partie ventrocaudale du locus coeruleus, la partie caudale du subcoeruleus, comme l'area postrema, dans la partie dorsomédiale du noyau interpédonculaire ainsi que dans l'aire tegmentaire ventrale (Törk, 1990).

b) Les différentes projections

Il a été rapporté différentes projections axonales sérotoninergiques suivant l'origine des corps cellulaires. Ces dernières peuvent être séparées en projections ascendantes et en projections descendantes (Figure 4).

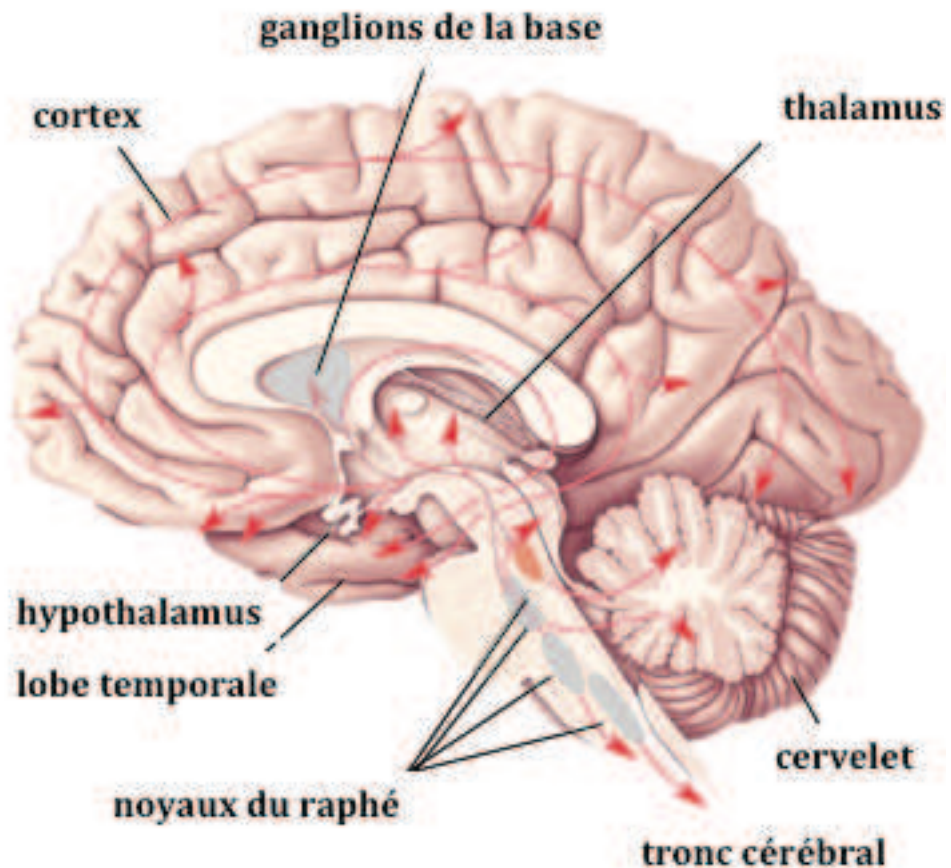


Figure 4 : Les différentes voies de projections du système sérotoninergique. Projections ascendantes à partir des noyaux du raphé dorsal et médian : lobe temporal, hypothalamus, néocortex, ganglions de la base et thalamus. Projections descendantes à partir du raphé caudal : cervelet et moëlle épinière.
(D'après <http://www.er.uqam.ca/nobel/d254000/neurochimie.htm>)

Les projections ascendantes

Les projections ascendantes proviennent principalement du noyau du raphé dorsal et du noyau du raphé médian, différenciées en deux systèmes distincts du point de vue de leurs organisations topographiques, mais aussi de leurs caractéristiques électrophysiologiques et morphologiques (Figure 5). Les régions innervées par les voies ascendantes sont le système limbique (cortex préfrontal, cortex cingulaire, cortex entorhinal, l'hippocampe, le noyau accumbens, le pallidum ventral, l'amygdale et l'hypothalamus antérieur), mais aussi les ganglions de la base et le diencephale (Törk, 1990). Des expériences combinant l'immunocytochimie de la 5-HT avec un marquage antérograde de *Phasoleus Vulgaris* Leucoagglutinine (PHA-L) montrent deux principaux types d'axones. L'un, plutôt fin, avec des varicosités provenant du noyau du raphé dorsal (NRD) et l'autre, épais et sans varicosités,

provenant du noyau du raphé médian (NRM) (Kosofsky and Molliver, 1987). Il est à noter que les principales projections venant du NRM innervent l'hippocampe dorsal, le septum médian et l'hypothalamus. Les axones provenant du NRD projettent dans le striatum, l'hippocampe ventral, l'amygdale et le septum latéral. En ce qui concerne le cortex, si la plupart des aires corticales reçoivent des projections à la fois du NRM et du NRD, il y a cependant des différences régionales dans le nombre de projections cellulaires de chaque noyau (Molliver, 1987). En plus des projections décrites précédemment, les noyaux du raphé projettent des axones collatéraux aux régions ayant une connectique avec leur fonction comme l'amygdale et l'hippocampe, ou encore la substance noire et le noyau caudé putamen (Imai et al., 1986 ; Köhler and Steinbusch, 1982).

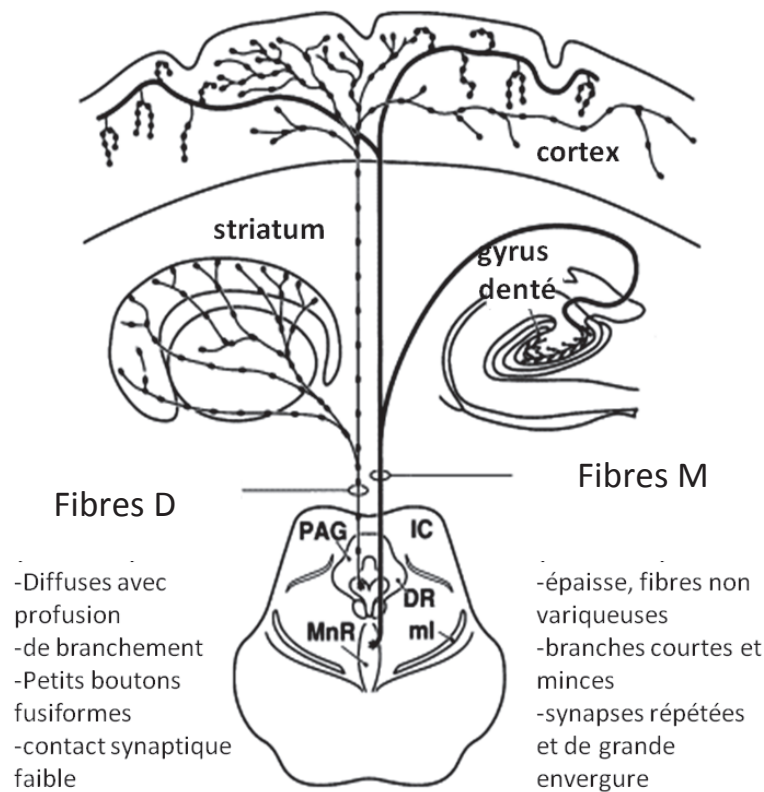


Figure 5 : Schéma représentant les différents types de projections ascendantes. Le noyau du raphé médian projette des axones fins avec des varicosités (Fibres D). L'autre type de projection provenant du noyau du raphé dorsal est composé d'axones épais non variqueux (Fibres M). (D'après Hensler 1999 ; Törk 1990)

Les projections descendantes

Les projections descendantes proviennent de la partie caudale des noyaux du raphé qui représentent 15% de la population neuronale sérotoninergique ([Hornung, 2003 pour revue](#)). Il y a beaucoup de projections sérotoninergiques dans la substance grise de la moëlle épinière. La plus grande projection descendante trouvant son origine dans le noyau du raphé magnus (B3) et la formation réticulée adjacente. Elle projette dans la corne dorsale, particulièrement vers la lamina I et dans une proportion moindre dans la lamina II. Les noyaux du raphé obscurus (B2) et du raphé pallidus projettent vers les motoneurones de la lamina IX de la corne ventrale. La dernière zone cible des projections sérotoninergiques descendantes est la colonne dite 'intermédiolatérale' qui reçoit des projections du noyau réticulaire paragigantocellulaire, et de la médulleuse ventrolatérale rostrale ([Törk, 1990](#)). En plus de ces différentes projections ascendantes et descendantes, il a aussi été décrit grâce à une technique de marquage rétrograde (à la « peroxydase de raifort » (Horseradish peroxydase, HRP)) que le noyau du raphé dorsal projette dans le noyau du raphé médian ([Hensler, 2006 pour revue](#)).

II) Les récepteurs sérotoninergiques

Peu avant les années 1960, les récepteurs sérotoninergiques ont tout d'abord été classés par Gaddum et Picarelli en deux types: les récepteurs M et les récepteurs D, nommés ainsi car des expériences montraient que la réponse fonctionnelle dans l'iléon de cobaye était bloquée par la morphine et le reste de l'activité était inhibée par la dibenzylamine (Gaddum and Picarelli, 1957). À partir de 1979, les récepteurs furent dénommés 5-HT₁ et 5-HT₂ et discriminés par leurs affinités respectives pour la sérotonine et pour ses premiers antagonistes (Peroutka and Snyder, 1979). Au cours des années suivantes, des études ont permis de découvrir jusqu'à seize types différents, regroupés en sept classes distinctes (5-HT₁ à 5-HT₇) (Hoyer, 2002 ; Hannon and Hoyer, 2008 ; Filip and Bader, 2009 + IUPHAR Database of Receptors and Ion Channels, www.iuphar-db.org). Ces récepteurs sont tous des récepteurs métabotropes liés à la protéine G, à l'exception du récepteur 5-HT₃ qui est un récepteur-canal ionique ou ionotrope.

1) Les récepteurs ionotropes

Ils jouent à la fois le rôle de récepteur et de canal ionique. L'activation de ces récepteurs se fait à la suite de la fixation du neurotransmetteur, provoquant son ouverture et ainsi l'entrée massive de Na⁺. Cette entrée d'ions positifs crée une dépolarisation de la membrane et ainsi une augmentation des décharges de l'influx nerveux (Figure 6).

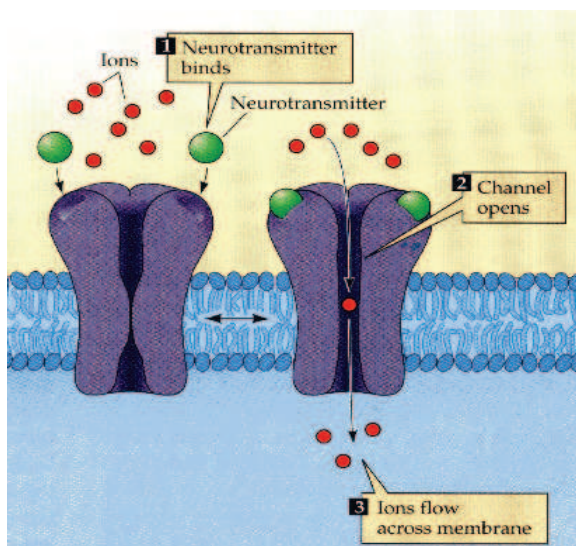


Figure 6: Schéma représentant les récepteurs à canaux ioniques. 1 : Fixation du neurotransmetteur. 2 : Ouverture du canal ionique. 3 : Entrée des ions. (Source: www.neuropsychopathologie.fr)

2) Les récepteurs métabotropes

Il est reconnu que 3 à 6 % des gènes d'un organisme codent pour les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), ce qui en fait l'une des plus grandes familles de protéines ([Gershengorn and Osman, 2001 pour revue](#)). Les récepteurs aux protéines G ont pour la plupart une conformation spatiale proche de celle du récepteur de la rhodopsine, cloné en 1984, et servant depuis de référence pour les études de modélisation moléculaire ([Palczewski, 2004](#)). Ils possèdent sept hélices alpha transmembranaires avec trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. L'extrémité amino-terminale se trouve du côté extracellulaire tandis que l'extrémité carboxy-terminale se trouve du côté intracellulaire. L'activation de la protéine G peut se faire grâce à différents effecteurs comme des photons, des ions Ca^{2+} , des stimuli sensoriels ou encore des molécules exogènes ou endogènes. L'activation d'un récepteur à la protéine G par la liaison d'un effecteur va entraîner un changement structurel du récepteur qui va devenir capable d'activer la protéine G à son tour. L'entité « protéine G » est en fait le complexe GDP lié du côté intracellulaire à trois sous-unités (alpha, bêta, gamma). Lors de l'échange du GDP par un GTP cytosolique, les sous-unités gamma et bêta restent fixées au récepteur tandis que l'élément alpha est libéré et est ainsi capable d'activer des effecteurs (qui, pour la plupart, modulent la concentration intracellulaire de seconds messagers comme l'AMP_c, l'IP₃, le DAG). En effet, les protéines G sont connues comme étant les molécules de transduction du signal les plus importantes.

Différentes sortes de protéines G existent et elles permettent de moduler la concentration de seconds messagers de plusieurs manières. Ainsi, il existe des protéines G_s qui stimulent la production d'AMP_c, alors que les protéines G_i l'inhibent. Les protéines G_q interviennent sur la phospholipase C. La sous-unité alpha contient une activité enzymatique qui hydrolyse le GTP en GDP ; elle devient ainsi inactive et retourne se fixer sur le récepteur sur les sous-unités gamma et bêta avec le GDP. Le cycle de transduction du signal est terminé et le récepteur est à nouveau prêt à être activé.

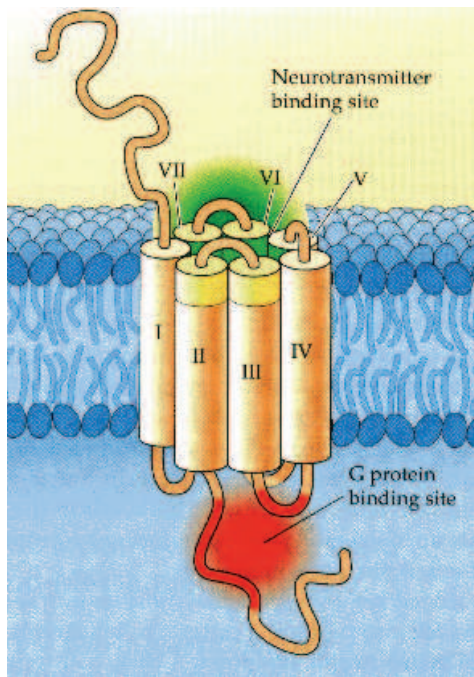


Figure 7 : Schéma représentant un récepteur métabotrope. Chaque récepteur est composé de sept domaines transmembranaires. Le côté extracellulaire est en vert avec les sites de fixation du neurotransmetteur. En rouge, du côté intracellulaire, le site de fixation de la protéine G. (Source : www.neuropsychopathologie.fr)

3) Les différentes sous-classes de récepteurs sérotoninergiques

a) 5-HT₁

Les récepteurs 5-HT₁ sont les récepteurs pour lesquels on possède le plus d'informations à l'heure actuelle. Ils sont divisés en cinq sous-unités : A, B, D, E et F, et sont tous liés aux protéines G. Les récepteurs 5-HT₁ sont majoritairement liés à la protéine G_{I/O}. Ils sont donc inhibiteurs de l'adénylate cyclase et leur activation entraîne une diminution de la concentration d'AMP cyclique intracellulaire (Hoyer, 2002). On peut remarquer qu'il n'y a pas de 5-HT_{1C}. En effet, celui-ci a été reclassé dans les récepteurs 5-HT₂ de part son homologie fonctionnelle et structurale avec ce sous-type de récepteur à la sérotonine (Hoyer and Martin, 1996 pour revue).

b) 5-HT₂

Il existe trois sous-classes de 5-HT₂ : 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}. Ces récepteurs sont couplés à la protéine G_Q/G₁₁ qui a pour rôle d'activer la phospholipase C (PLC). La PLC activée catalyse l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en inositol-1, 4, 5-phosphate (IP₃) et diacylglycérol. Les IP₃ ont pour rôle d'augmenter la concentration intracellulaire de calcium et le diacylglycérol active la protéine

kinase C (PKC). Ces récepteurs sont aussi liés à la protéine $G_{12/13}$, connue pour avoir un rôle dans les changements structuraux des cellules (Hannon and Hoyer, 2008). Le récepteur 5-HT_{2A} correspond au récepteur D décrit en 1957 par Gaddum et Picarelli (Gaddum and Picarelli, 1957). En ce qui concerne le 5-HT_{2B}, il était autrefois appelé 5-HT_{2F} de part sa localisation dans le fundus de l'estomac de rat (Cox and Cohen, 1996). Enfin, le 5-HT_{2C} est l'ancien 5-HT_{1C} qui a été reclassé depuis par l'IUPHAR (Database of Receptors and Ions Channels).

c) 5-HT₃

Le récepteur 5-HT₃ est l'unique récepteur à canal ionique. Il correspond au récepteur M décrit par Gaddum et Picarelli en 1957 (Gaddum and Picarelli, 1957) et existe en cinq sous-classes : 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} et 5-HT_{3E}. Les trois derniers sont uniquement retrouvés chez l'humain. Le récepteur 5-HT₃ étant un récepteur canal, son ouverture provoque l'entrée rapide de Na⁺ et de Ca²⁺ ainsi qu'une sortie de K⁺ ce qui provoque une dépolarisation neuronale rapide entraînant l'excitation de certaines régions.

d) 5-HT₄

Le récepteur 5-HT₄ a été identifié initialement chez plusieurs espèces : la souris, le cochon d'inde (Bockaert et al., 1992), le rat (Clarke et al., 1989) avant d'être clonés en 1994 (Gerald et al., 1995). Ce récepteur a sept isoformes variant pour leur partie C terminale. Ces isoformes sont nommées : 5-HT_{4A}, 5-HT_{4B}, 5-HT_{4C}, 5-HT_{4D}, 5-HT_{4E}, 5-HT_{4F}, 5-HT_{4G}, 5-HT_{4H}. Une forme supplémentaire avec une insertion de quatorze acides aminés dans la seconde boucle extracellulaire a également été proposée (Bender et al., 2000). La famille du récepteur 5-HT₄ est liée positivement à la protéine G_s ce qui provoque l'activation de l'adénylate cyclase et donc l'augmentation de la concentration d'AMP cyclique.

e) 5-HT₅

Il existe deux groupes de 5-HT₅ : les 5-HT_{5A} et 5-HT_{5B}. Les récepteurs 5-HT₅ semblent être couplés négativement à l'adénylate cyclase et donc induisent préférentiellement une inhibition de la production d'AMP cyclique stimulée par la forskoline (Filip and Bader, 2009).

f) 5-HT₆

Les récepteurs 5-HT₆ ont été clonés en 1993 (Monsma et al., 1993 ; Ruat et al., 1993a). Ils existent sous deux formes car le gène contient deux introns, mais aucune différence pharmacologique n'existe entre les deux variants. Comme les récepteurs 5-HT₄, les récepteurs 5-HT₆ sont couplés positivement à la protéine G_s et activent donc la formation d'AMP cyclique grâce à l'augmentation de l'activité de l'adenylate cyclase.

g) 5-HT₇

Les récepteurs 5-HT₇ ont été les derniers découverts (Bard et al., 1993 ; Plassat et al., 1993 ; Lovenberg et al., 1993 ; Shen et al., 1993 ; Ruat et al., 1993b ; Meyerhof et al., 1993). Ils existent sous quatre formes distinctes (5-HT_{7A}, 5-HT_{7B}, 5-HT_{7C}, 5-HT_{7D}) qui diffèrent dans leur terminaison carboxyle mais qui n'ont pas actuellement de différence pharmacologique notable (Heidman et al., 1997). Les variants A et B existent à la fois chez le rat et chez l'homme, tandis que les variants C et D sont respectivement spécifiques du rat et de l'homme. Tout comme les récepteurs 5-HT₄ et 5-HT₆, les récepteurs 5-HT₇ sont couplés positivement à la protéine G_s.

Après avoir parcouru l'ensemble des récepteurs sérotoninergiques, nous allons nous intéresser plus spécifiquement aux récepteurs de la famille 5-HT_{1A} et aux récepteurs de la famille 5-HT₇, objets de nos travaux.

4) Les récepteurs 5-HT_{1A}

Le récepteur 5-HT_{1A} est le plus étudié des récepteurs à la 5-HT. En effet, les premières études ont eu lieu dans le début des années 80 avec la découverte des sites de liaisons des récepteurs 5-HT_{1A} grâce à l'emploi de 5-HT tritiée (Pedigo et al., 1981 ; Middlemiss and Forzard, 1983). Par la suite, la synthèse et la caractérisation du premier agoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{1A}, le 8-OHDPAT, (Arvidsson et al., 1981) puis son radiomarquage au tritium ont permis de faire les

premières études de localisation du récepteur 5-HT_{1A} (Gozlan et al., 1983 ; Hamon et al., 1990 pour revue).

a) Structure moléculaire du récepteur 5-HT_{1A}

Le récepteur 5-HT_{1A} a été le premier des récepteurs à la sérotonine entièrement cloné et séquencé (Fargin et al., 1988 ; Albert et al., 1990). Il possède 50 % d'homologie avec le récepteur bêta 2-adrénergique au niveau de son domaine transmembranaire (Kobilka et al., 1987). Sa structure confirme son appartenance à la famille des récepteurs couplés à la protéine G (Figure 8). En effet, il a une structure tertiaire composée de sept domaines transmembranaires (Hoyer et al., 1994) présentant un site de glycosylation dans la partie extracellulaire amino terminale et un site de phosphorylation pour la PKC sur les 2^{ème} et 3^{ème} boucles intracellulaires. Ce gène, de type « intronless », a été localisé sur le chromosome 13 chez la souris et sur le chromosome 5 chez l'homme (5q11.2-q13). Le récepteur est composé de 421 acides aminés chez l'homme et de 422 acides aminés chez le rat, ce qui leur confère une homologie de 89%.

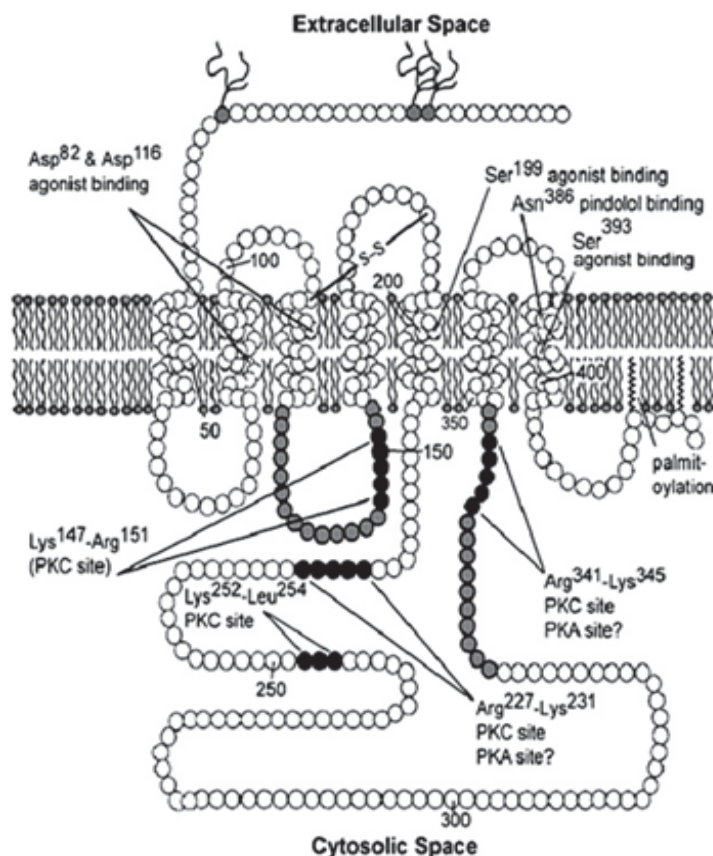


Figure 8 : Représentation topographique en 2D du récepteur humain 5-HT_{1A} (d'après Raymond et al., 1999). Chaque cercle représente un acide aminé. La numérotation des acides aminés commence à partir de la méthionine initiatrice. L'extrémité « amino » est face à l'espace extracellulaire, et l'extrémité « carboxyle » fait face au cytoplasme. Sept tronçons transmembranaires, composés chacun de 820 ± 26 acides aminés hydrophobes, sont reliés par trois boucles extracellulaires (appelée E1, E2 et E3) et trois boucles intracellulaires (appelé i1, i2 et i3). Il y a trois sites potentiels de N-glycosylation sur l'extrémité amino-terminale. La Ser199 (en TM5) est importante pour la liaison de la 5-HT. L'Asn200 (en TM5) est importante tant pour les liaisons des agonistes et des antagonistes. L'Asp386 (en TM7) joue un rôle dans la liaison sélective du pindolol. La Ser393 et la Ser396 (également dans TM7) sont importantes pour la fixation des agonistes. Les domaines intracellulaires contiennent des sites qui sont importants pour la mise en contact des protéines G en particulier l'ensemble de la boucle i2 et l'extrémité carboxy terminale de la boucle i3 (cercles gris). Les sites potentiellement impliqués dans la phosphorylation par la PKA et la PKC sont représentés par des cercles noirs.

b) Distribution régionale et localisation subcellulaire du récepteur 5-HT_{1A}

La cartographie des récepteurs 5-HT_{1A} a été faite dans un premier temps grâce à des techniques d'autoradiographie *in vitro* faisant intervenir le [³H]8-OHDPAT (Gozlan et al., 1983 ; Hall et al., 1985), seul radioligand spécifique de l'époque. Ensuite, d'autres radioligands tels que l' [³H]ipsaspirone (Dompert et al., 1985), le [³H]méthyl-urapidil (Laporte et al., 1991) ou encore le [³H]WAY100635 (Gozlan et al., 1988) ont été utilisés avec succès. Des ligands marqués à l'iode, tel que le

[¹²⁵I]MPPI, ont complété la série peu après (Kung et al., 1994). En 1997, une équipe a étudié la localisation des récepteurs 5-HT_{1A} sur des coupes de cerveau humain *post-mortem* en comparant la liaison du [³H]WAY100635 et celle du [¹¹C]WAY100635 utilisable en imagerie *in vivo* (Hall et al., 1997). L'ensemble de ces études autoradiographiques chez l'animal et l'homme montrent une grande densité de récepteurs 5-HT_{1A} dans le gyrus denté et l'aire CA₁ de la corne d'Ammon de l'hippocampe, mais également dans le septum latéral, le cortex frontal et entorhinal et, enfin, dans le noyau du raphé dorsal et médian. Des sites de liaison de densité moindre sont trouvés dans certains noyaux thalamiques et hypothalamiques. Enfin, des régions comme le striatum, la substance noire et le cervelet sont quasiment dépourvus de récepteurs 5-HT_{1A} (Lanfumey and Hamon, 2000).

Pour compléter ces données liées l'expression protéique des 5-HT_{1A}, des études d'hybridation *in situ* avec différentes sondes sélectives marquées au [³²P] ont été réalisées pour étudier la distribution de l'ARNm des récepteurs 5-HT_{1A} (Chalmers and Watson, 1991 ; Miquel et al., 1991 ; Pompeiano et al., 1992). Ces sondes correspondent à des parties hautement sélectives de la 3^{ème} boucle intracellulaire et de la partie amino-terminale de la séquence peptidique. Ces études ont montré que l'ARNm du récepteur 5-HT_{1A} était localisé dans les mêmes régions que celles qui comportent son expression protéique. Les récepteurs 5-HT_{1A} ne sont donc pas transportés loin de leur lieu de synthèse et sont adressés dans le compartiment somatodendritique du neurone. Les récepteurs 5-HT_{1A} sont localisés à la fois au niveau postsynaptique de neurones 5-HT dans les régions du prosencéphale et sur les neurones 5-HT, eux-mêmes dans les somas et dendrites du mésencéphale et des noyaux du raphé (Kia et al., 1996).

La distribution subcellulaire des récepteurs 5-HT_{1A} n'étant pas accessible avec les techniques citées précédemment, des anticorps polyclonaux spécifiques des 5-HT_{1A} ont été produits chez le lapin (El Mestikawy et al., 1990). Ces derniers sont dirigés contre une portion de la 3^{ème} boucle intracellulaire de la protéine de rat. Ils ont permis d'observer l'immunoréactivité des récepteurs 5-HT_{1A} à un niveau microscopique subcellulaire dans le cerveau de rat adulte (Kia et al., 1996 a,b). Les plus hautes densités d'immunomarquage ont été trouvées dans le système

limbique (septum latéral, aire CA₁ de la corne d'Ammon et gyrus denté), dans le cortex frontal et entorhinal, dans le noyau du raphé antérieur et le noyau interpedonculaire. Cette distribution est en accord avec les expériences d'autoradiographie et d'hybridation *in situ* citées précédemment (Kia et al., 1996 a,b ; Marcinkiewicz et al., 1984). Des études de double immunomarquage avec un anticorps anti-récepteur 5-HT_{1A} et anti-5-HT montrent que dans le raphé dorsal et médian, les cellules marquées avec l'anti-5-HT_{1A} sont des neurones sérotoninergiques (Sotelo et al., 1990). Plus récemment, des études combinant la microscopie électronique et l'immunocytochimie ont permis d'observer dans le NRD que l'immunoréactivité des récepteurs 5-HT_{1A} se situait dans les somas et les dendrites. Pour l'hippocampe, ce sont les somas et les dendrites des cellules pyramidales de l'aire CA₁ ainsi que des cellules granulaires qui montrent une immunoréactivité aux récepteurs 5-HT_{1A} (Riad et al., 2001).

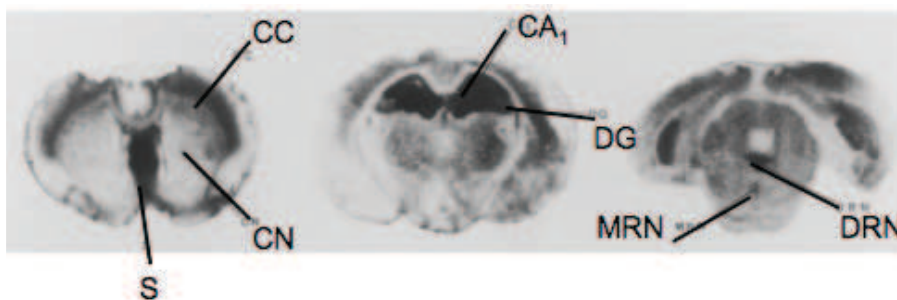


Figure 9 : Immunoautoradiographie de la distribution du récepteur 5-HT_{1A} dans le cerveau de rat. (coupe frontale de 20µm). Les coupes ont été incubées en présence d'anticorps dirigé contre la 3^{ème} boucle cytoplasmique de récepteur 5-HT_{1A}. Les structures radiomarquées ont été révélées avec la protéine marquée au soufre 35. Légende: CC : cortex calleux, S : septum, CN : noyau caudé, CA1 : cellules pyramidales de la corne d'Ammon, DG : gyrus denté, MRN : noyau du raphé médian, DRN : noyau du raphé dorsal. (D'après El Mestikawi et al., 1991).

c) Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques du récepteur 5-HT_{1A}

Les récepteurs 5-HT_{1A} sont couplés négativement à la protéine G par l'intermédiaire des protéines G_i/G_o qui inhibent l'activité de l'adenylyl cyclase préalablement stimulée par la forskoline. Ils sont aussi impliqués dans des changements de perméabilité membranaire. Dans le cortex cérébral, les récepteurs 5-HT_{1A} interagissent également avec les protéines Gα_o et Gα_{i3}. Pour l'hippocampe, ils interagissent d'avantage avec les protéines Gα_{i3}, alors que, dans le raphé antérieur, il n'y a que les protéines Gα_{i3} qui sont sollicitées (Mannoury la Cour et

al., 2006). Au niveau du NRD et de l'hippocampe, l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} permet l'ouverture de canaux potassiques, ce qui engendre à la fois une hyperpolarisation membranaire mais aussi une diminution de la résistance de la membrane (Cossery et al., 1987).

L'activation des autorécepteurs 5-HT_{1A} situés sur les corps cellulaires sérotoninergiques du NRD, entraîne une diminution de l'activité des neurones sérotoninergiques et donc de la libération du neurotransmetteur. Ils agissent par un rétrocontrôle sur la libération de la 5-HT. Les récepteurs 5-HT_{1A} sont également situés de manière postsynaptique sur les corps cellulaires de neurones non sérotoninergiques, appelés « hétérorécepteurs », et ont des effets qui miment ceux de la sérotonine (Lanfumeey and Hamon, 2004).

D'un point de vue pharmacologique, les récepteurs 5-HT_{1A}, comme la plupart des récepteurs couplés aux protéines G, existent sous deux conformations: une conformation à haute affinité et une conformation à basse affinité, en fonction de leur liaison à la 5-HT (Emerit et al., 1990 ; Kobilka, 1992 pour revue). Les agonistes endogènes ou exogènes se fixent de manière préférentielle aux récepteurs à haute affinité considérés comme fonctionnels. Les antagonistes se fixent de manière indifférente sur les deux conformations. Cette fixation différente entre agoniste et antagoniste a pu être observée dans une étude d'autoradiographie *in vitro* utilisant le [³H]WAY100635 et le [³H]8-OHDPAT et permettant ainsi de voir la densité de liaison des récepteurs. Cette densité dans l'aire CA₁ de l'hippocampe (région riche en récepteurs 5-HT_{1A}) est de 314 fmol/mg de tissu pour le [³H]WAY100635 et de 196 fmol/mg de tissu pour le [³H]8-OHDPAT (Burnet et al., 1997). Plusieurs agonistes et antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} sont apparus au fur et à mesure des années. Dans les années 1980, le 8-OHDPAT, de la famille des aminotétralines, a été synthétisé et caractérisé comme agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} avec un Ki de 0,7nM vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A} (Nénonéné et al., 1994). Plusieurs autres agonistes de la même famille chimique ont été découverts, comme le 8-OHPIPAT (Zhuang et al., 1993). Cependant, quelques années plus tard, il a été montré que le 8-OHDPAT, longtemps considéré comme un agoniste spécifique, avait aussi une affinité pour les récepteurs 5-HT₇ avec un Ki de 35-52nM (Sheng et al., 1993 ; Lovenberg et al., 1993 ; Pauwels and Colpaert, 2003).

D'autres familles chimiques ont été explorées, comme la famille des pipérazines et des indoles. Des molécules comme la BP 554, le S14506 pour les pipérazines ou encore l'U92016A pour les indoles montrent une activité d'agoniste « total » vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A} (Malgorzata and Bader, 2009). Des molécules développées ultérieurement pour leurs propriétés anxiolytiques, telles que la buspirone, l'ipsasirone ou encore la gespirone, montrent des activités d'agonistes « partiels » (Malgorzata and Bader, 2009). D'autres molécules de la famille des pipérazines comme le P-MPPI, le WAY100635, le WAY101405 ou encore le MPPF, montrent une bonne pénétration du système nerveux central et ont des propriétés antagonistes vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A} (Hoyer et al., 2002).

À l'heure actuelle, des études sont toujours en cours pour synthétiser et caractériser des molécules ayant la meilleure affinité possible pour les récepteurs 5-HT_{1A} et une très bonne spécificité. Une équipe de recherche du département de neurobiologie des laboratoires Pierre Fabre (Castres) a synthétisé récemment des molécules de la famille des pipéridines montrant une très bonne affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A} et une meilleure sélectivité que le 8-OHDPAT. Il s'agit, entre autres, du F13714 qui a un Ki de 0,01-0,05nM pour les 5-HT_{1A} (Vacher et al., 1998 ; 1999 ; Newman-Tancredi et al., 2009) et du F15599 qui a un Ki de 2,24 nM (Maurel et al., 2007), et dont nous parlerons ultérieurement.

5) Les Récepteurs 5-HT₇

Parmi l'ensemble des récepteurs de la sérotonine, les récepteurs 5-HT₇ ont été les derniers récepteurs à avoir été découverts. Dans un premier temps, ils ont été appelés 5-HT_{1A-like}, du fait de certaines similitudes avec les récepteurs 5-HT_{1A} mais des études ultérieures de distribution cellulaire et de transduction du signal ont permis de les différencier. Il est à noter que l'étude de ces récepteurs a pu se faire de manière plus rapide que celle des 5-HT_{1A}, du fait du nombre important de techniques disponibles lors de leur découverte.

a) Structure du récepteur 5-HT₇

Le récepteur 5-HT₇ a été cloné et séquencé en 1993 par différentes équipes indépendantes, grâce à un criblage utilisant comme sondes des oligonucléotides dérivant du gène du récepteur à la sérotonine chez la drosophile (5-HT_{dro1}) ou du gène de la substance P, tant chez la souris (Plassat et al., 1993), que chez le rat (Lovenberg et al., 1993 ; Ruat et al., 1993 ; Meyerhof et al., 1993 ; Shen et al., 1993) et chez l'humain (Bard et al., 1993). Le gène du récepteur 5-HT₇ possède deux introns et est localisé sur le chromosome 10 humain (10q21 -q24 ; Gelernter et al., 1995). Le 1^{er} intron a été observé chez l'homme et le rat dans la région de la seconde boucle intracellulaire du récepteur 5-HT₇ (Bard et al., 1993 ; Ruat et al., 1993 ; Shen et al., 1993). L'équipe de Ruat a localisé la seconde région intronique dans une partie du gène correspondant à la terminaison carboxyle extracellulaire (Heidmann et al., 1997). Le récepteur est long de 445 acides aminés, sans les épissages alternatifs (Figure 11). Cependant, l'équipe de Lovenberg a publié une séquence d'ADN_c qui diffère de cinq paires de bases dans le second intron par rapport aux autres équipes (Lovenberg et al., 1993). La présence d'intron dans le gène a suggéré la possibilité d'épissage alternatif du gène et donc de production potentielle d'isoformes. L'équipe de Heidmann et al. (1993) a étudié ce phénomène et a proposé quatre isoformes du gène du récepteur 5-HT₇ au niveau de la terminaison carboxyle terminale. Les quatre isoformes sont appelées 5-HT_{7A}, 5-HT_{7B}, 5-HT_{7C} et 5-HT_{7D}. Il est à noter que seuls les 5-HT_{7A}, 5-HT_{7B} et 5-HT_{7C} sont présentes chez le rat. L'isoforme 5-HT_{7C} n'est pas présente chez l'homme, mais celui-ci possède une isoforme supplémentaire, 5-HT_{7D}, qui est présente majoritairement dans la rate (Heidmann et al., 1997). Ce récepteur est très peu similaire aux autres récepteurs de la sérotonine, avec environ 50% d'homologie, par contre, il présente une très forte homologie interespèce d'environ 95%.

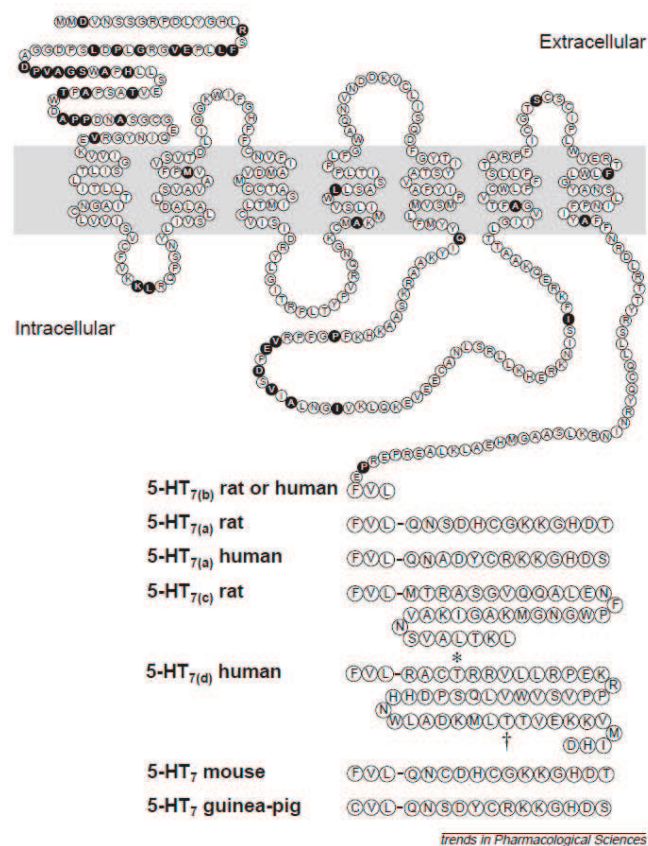


Figure 11 : Représentation topographique en 2D du récepteur 5-HT₇ et de ses isoformes (d'après Vanhoenacker et al, 2000). Chaque cercle représente un acide aminé. La numérotation des acides aminés commence à partir de la méthionine initiatrice. L'extrémité amino fait face à l'espace extracellulaire, et l'extrémité carboxyle fait face au cytoplasme. Pour toutes les espèces, les introns sont situés dans le codon pour la leucine, où les séquences prévues divergent. Aucun des sites de phosphorylation n'a été trouvé dans les extrémités C du rat et des variants d'épissage de l'homme 5-HT₇ (a) et 5-HT₇ (c). Cependant, deux sites potentiels de phosphorylation ont été trouvés dans la séquence protéique déduite de l'isoforme humaine 5-HT₇ (d). Le site de la protéine kinase C est indiqué par un astérisque et le site de la caséine kinase II est indiqué par une croix.

b) Distribution cellulaire du récepteur 5-HT₇

La localisation de l'ARNm du récepteur 5-HT₇ a été réalisée grâce à des techniques de Northern Blot, d'hybridation *in situ* ou encore de PCR avec transcriptases inverses. Les études de Northern Blot chez le rat ont révélé deux ARNm, de 3,9kb et de 3,1kb, respectivement (Ruat et al., 1993), localisés de manière préférentielle dans le thalamus, l'hypothalamus, le tronc cérébral, l'hippocampe et, à un niveau moindre, dans l'estomac et l'iléon. Les études d'hybridation *in situ* (réalisées avec de l'ARN sens et antisens marqué au soufre 35) montrent une distribution assez hétérogène dans le cerveau (Figure 12). Les niveaux les plus denses sont situés

dans le cortex rétrospinal, l'hippocampe, la tenia tecta, le gyrus supracalleux, l'hypothalamus postérieur, mais aussi le noyau amygdaloïde médian, le noyau paraventriculaire du thalamus, la couche des cellules de Purkinje du cervelet, le noyau pontique des noyaux du raphé et, enfin, dans le colliculus supérieur (Ruata et al., 1993 ; Neumaier et al., 2001). Les récepteurs 5-HT₇ sont aussi retrouvés en plus faible quantité dans le système périphérique, dans le foie, le pancréas, la rate et les reins. Cependant, de fortes quantités d'ARNm sont retrouvées dans l'artère coronarienne et le tractus gastro-intestinal (colon, estomac, iléon) supposant une action du récepteur dans la relaxation des muscles lisses (Ruata et al., 1993). Des études d'immunocytochimie, ainsi que de stimulation de l'expression de C-Fos, confirment les distributions des ARNm (Neumaier JF et al., 2001).

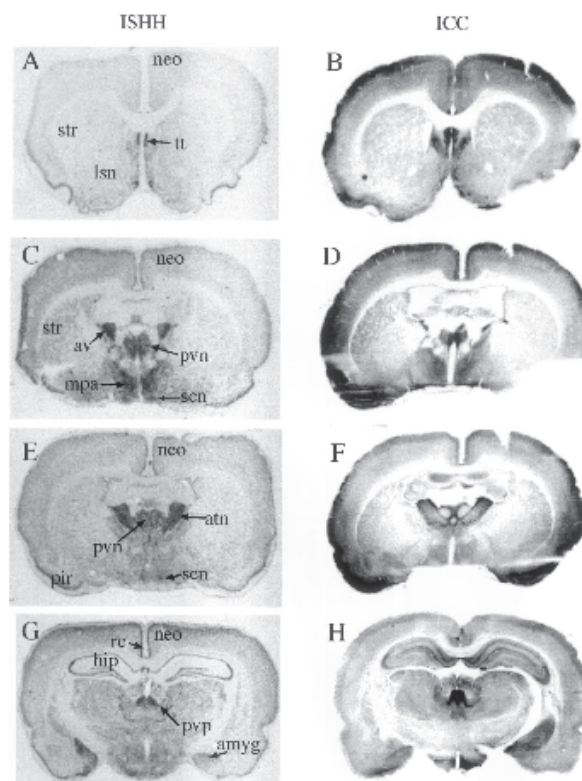


Figure 12 : Comparaisons entre la visualisation par hybridation in situ de l'ARNm des récepteurs 5-HT₇ (colonne de gauche) et la visualisation par immunocytochimie des protéines 5-HT₇ (colonne de droite) (X10) (d'après Neumaier et al., 2001). On peut voir une forte similitude entre la distribution de l'ARNm et l'immunoréactivité de 5-HT₇ bien que, dans quelques régions, la protéine du récepteur apparaît en plus forte densité par exemple dans l'hippocampe. (amyg : amygdale. av : noyau thalamique anteroventral. atn : noyau thalamique paraventriculaire. pvp : noyau paraventriculaire postérieur. rc : cortex rétrospinal. scn : noyau suprachiasmatique. str : striatum. tt : tenia tecta.)

Des études autoradiographiques cherchant à confirmer la distribution des récepteurs 5-HT₇ ont été réalisées avec différents ligands tritiés tels que la [³H]mésulergine, le [³H]SB269970, la [³H]5-CT et la [³H]5-HT (Sleight et al., 1995 ; Stowe and Barnes, 1998 ; Thomas et al., 2000 ; Varnäs et al., 2004 ; Martin-Cora and Pazos, 2004). Cependant, les récepteurs 5-HT₇ ayant été les derniers récepteurs de la sérotonine découvert, peu de radioligands spécifiques existent. En effet, la plupart des molécules tritiées présentent une affinité pour les récepteurs 5-HT₇ mais également pour les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}. Il est donc indispensable d'utiliser des composés non marqués en compétition comme le pindolol (ayant une affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}) afin de révéler le signal autoradiographique lié aux récepteurs 5-HT₇ (Stowe and Barnes, 1998). La même technique a été utilisée avec la mésulergine tritiée qui, elle aussi, n'est pas sélective des récepteurs 5-HT₇ et à laquelle il a été nécessaire d'ajouter du raclopride et du DOI (1-(2,5-diméthoxy-4-iodophényl)-2-aminopropane) afin « d'effacer » la contribution des récepteurs D₂ et des récepteurs 5-HT₂ (Martin-Cora and Pazos, 2004). Grâce à ces techniques, on a pu observer la localisation des récepteurs 5-HT₇ dans le noyau caudé et le putamen, la couche de cellules pyramidales de l'aire CA₂ de l'hippocampe mais aussi dans le noyau thalamus médian et du noyau du raphé dorsal. Le gyrus denté de l'hippocampe, ainsi que le cortex frontal, le noyau subthalamique et le colliculus supérieur montrent des densités de liaisons moins importantes.

À la suite de ces expériences initiales d'autoradiographie avec des ligands peu spécifiques, des molécules ayant une forte affinité, et surtout une meilleure spécificité pour les récepteurs 5-HT₇, ont été proposées. Ainsi, en 2004, l'équipe de Varnäs a réalisé des expériences d'autoradiographie en utilisant le SB269970 tritié (Varnäs et al., 2004). Les structures marquées avec ce radiotraceur ont été en accord avec les études précédentes, avec un « binding » marqué dans le thalamus antérieur et le gyrus denté et un marquage un peu plus faible pour l'hypothalamus, le gyrus cingulaire antérieur, l'hippocampe, l'amygdale et certains noyaux du tronc cérébral. Au niveau périphérique, les récepteurs 5-HT₇ sont exprimés dans les muscles lisses non vasculaires (Ulmer et al., 1995 ; Carter et al., 1995). De plus, les récepteurs 5-HT₇ ont une densité moins importante que les récepteurs 5-HT_{1A}. En effet, des études d'autoradiographie *in vitro* avec le

[³H]SB269970 ont montré que le Bmax dans la membrane de cerveau humain est de 68 fmoles/mg protéine-1 (Thomas et al., 2002), alors que des expériences similaires pour les récepteurs 5-HT_{1A} avec le [³H]WAY100635 révèlent un Bmax de 314 fmoles/mg de tissus pour l'aire CA1 de l'hippocampe (Burnet et al., 1997).

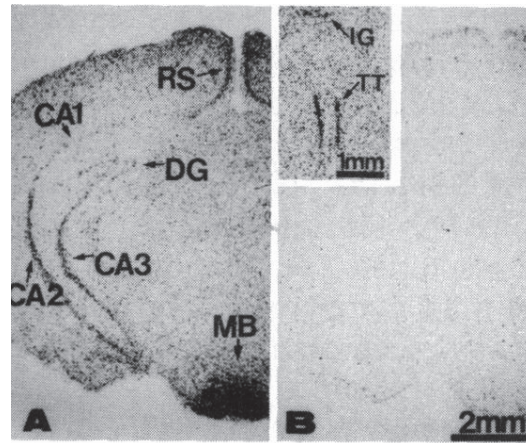


Figure 13 : Localisation des transcripts du gène des récepteurs 5-HT₇ dans des sections frontales du cerveau de rat en hybridation in situ (d'après Ruat et al., 1993). Les sondes ARN antisens marquées au soufre 35 A et B non sens ou sens (B) correspondent à des parties C-amino terminal. (CA₁₋₃ : couche de la corne d'Ammon. DG : gyrus denté. IG : indusium griseum ou gyrus supracalleux. MB : corps mammilaire. RS : cortex retrospinal. TT : ténia tecta).

c) Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques du récepteur 5-HT₇

Le récepteur 5-HT₇ fait partie de la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G et est couplé de manière positive à l'adenylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G_s alpha qui stimule sa production. Il n'y a, ni inhibition de l'adenylate cyclase, ni activation de la PLC. Comparativement aux autres récepteurs de la famille 5-HT liés à la G_s, tels que les 5-HT₄ et les 5-HT₆, il a peu d'homologie pour la séquence en acides aminés. En effet, le domaine transmembranaire possède respectivement 39% et 46% d'homologie avec les récepteurs R 5-HT₆ et R 5-HT₄ (Vanhoenacker et al., 2000). Il est à relever que chez l'espèce humaine, le 5-HT_{7D} se couple moins efficacement que les isoformes A et B pour l'activation de l'adénylate cyclase. L'activation des récepteurs 5-HT_{7A} dans les cellules HEK293 stimule les isoformes de l'adenylate cyclase 1 et 8 insensibles à la G_s et l'isoforme 5, qui elle, est sensible. La sérotonine module la concentration d'AMP cyclique dans certaines régions du cerveau contenant des récepteurs 5-HT₇

en mobilisant le calcium intracellulaire après l'activation des récepteurs 5-HT_{7A} (Barnes and Sharp, 1999). Enfin, il est important de noter qu'à ce stade des connaissances, il n'y a aucune différence, tant pour la pharmacologie que pour la transduction du signal et pour la distribution cellulaire dans toutes les isoformes (Jasper et al., 1997 ; Heidmann et al., 1998).

D'un point de vue pharmacologique, il n'existe pas encore d'agoniste spécifique des récepteurs 5-HT₇. La 5-carboxytryptamine (5-CT) a bien des propriétés d'agoniste 5-HT₇ mais elles sont non spécifiques (Thomas et al., 1999). Il y a d'avantage d'outils pharmacologiques 5-HT₇ qui ont des propriétés antagonistes. Ainsi, des molécules décrites pour leurs propriétés hallucinogènes (tel que le LSD), ou antipsychotiques (telles que la rispéridone, la clozapine) ou antidépessives (telle que l'amitriptyline) sont des antagonistes des récepteurs 5-HT₇ (mais de manière non spécifique). Il y a donc eu nécessité de développer des molécules plus spécifiques pour l'étude pharmaceutique des récepteurs 5-HT₇.

Le SB258719 a été le premier dérivé sulfonylé synthétisé, décrit initialement avec des propriétés antagonistes (Forbes et al., 1998). Cependant, il s'est avéré agoniste inverse pour le récepteur 5-HT₇ (Mahé et al., 2004). Ce composé est 100 fois plus affiné pour les récepteurs 5-HT₇ que pour les autres récepteurs sérotoninergiques, avec un pK_i de 7,5 (Forbes et al., 1998). D'autres molécules dérivées de tétrahydrobenzendoles ont été évaluées, tels que le DR4004, un antagoniste présentant une bonne affinité et sélectivité pour les 5-HT₇, avec un pK_i de 8,67 (Kikuchi et al., 1999).

Un autre groupe de recherche a proposé des dérivés des pyrroles, dont le SB269970, (un pK_i de 8,9 vis-à-vis des 5-HT₇) est le chef de file (Lovell et al., 2000). Ainsi, le SB269970 (distribué par Sigma-Aldrich) est à l'heure actuelle le ligand le plus utilisé pour caractériser les récepteurs 5-HT₇. Cependant, si le SB269970 a initialement été considéré comme un antagoniste pur, une étude a montré qu'il avait des propriétés d'agoniste inverse, tout comme le SB258741 ou encore le SB258719 (Mahé et al., 2004). Pour rappel, un agoniste inverse est une molécule qui se fixe sur un site différent de l'agoniste mais qui crée un changement de conformation empêchant la fixation de l'agoniste. Il y a donc une différence de mécanisme de liaison avec un antagoniste pur qui se fixe sur le

même site que l'agoniste. Si les effets d'un antagoniste et d'un agoniste inverse peuvent être identiques d'un point de vue fonctionnel, il s'agit bien de deux mécanismes moléculaires distincts.

En 2009, une nouvelle série de ligands 5-HT₇ a été synthétisée à partir de modifications du pharmacophore du récepteur 5-HT₇ (Lopez-Rodriguez et al., 2003). Il est à noter que beaucoup de molécules développées présentent des affinités de liaisons proches pour les récepteurs 5-HT₇ et pour les récepteurs 5-HT_{1A} (Médina et al., 2009). L'exemple le plus connu est le 8-OHDPAT, longtemps « agoniste de référence » des récepteurs 5-HT_{1A} mais qui a aussi une bonne affinité pour les récepteurs 5-HT₇ (Sprouse et al., 2004 ; Hedlund and Sutcliffe, 2004).

Très récemment, le LP-211 a été proposé comme molécule agoniste des récepteurs 5-HT₇, montrant une bonne pénétration cérébrale (Hedlund et al., 2010).

6) Les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇ comme cibles thérapeutiques

a) Les récepteurs 5-HT_{1A}

Comme il a été précisé précédemment, les récepteurs 5-HT_{1A} sont situés dans le gyrus denté, l'aire CA1 de l'hippocampe, le septum latéral, le cortex frontal et entorhinal mais aussi dans le noyau du raphé dorsal. Le thalamus et l'hypothalamus contiennent également des récepteurs, mais en quantités moins importantes. Cette distribution cérébrale des 5-HT_{1A} suggère une implication dans les troubles de l'humeur, mais aussi dans la régulation de la température corporelle. Le sommeil, la neurogenèse, la mémoire et les réponses neuroendocrines sont aussi modulés sous l'action des récepteurs 5-HT_{1A}. Au plan périphérique, les récepteurs 5-HT_{1A} agissent aussi dans la régulation du système cardiovasculaire (Nalivaiko and Sgoifo, 2009). Des auteurs mentionnent également l'implication des récepteurs 5-HT_{1A} dans des pathologies comme l'Alzheimer, la schizophrénie ou la dépression, grâce aux études d'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A} chez les patients en comparaison avec des sujets sains (Borg et al., 2008).

🌀 Rôle dans l'anxiété

Des études d'inactivation du gène des récepteurs 5-HT_{1A} ont permis de voir que les récepteurs 5-HT_{1A} étaient bien impliqués dans la régulation de l'humeur. Les souris KO 5-HT_{1A} présentent une augmentation de l'anxiété (Heisler et al., 1998 ; Parks et al., 1998 ; Ramboz et al., 1998) et ne répondent pas au traitement antidépresseur avec les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (Santarelli et al., 2003). Il est à noter que la surexpression des récepteurs 5-HT_{1A} dans le début du développement réduit l'anxiété (Kusserow et al., 2004). Chez les souris KO 5-HT_{1A}, l'expression du récepteur 5-HT_{1A} au cours des premiers mois maintient le phénotype anxieux ce qui suggère que les récepteurs 5-HT_{1A} post synaptiques sont essentiels dans le maintien du phénotype anxieux (Albert et Le Francois, 2010). Dans une autre expérience, des souris obtenues avec une surexpression de 30% de leurs autorécepteurs 5-HT_{1A} du noyau du Raphé, affichent une diminution de la décharge des neurones sérotoninergiques, ainsi qu'une diminution du relargage de la sérotonine, ce qui s'accompagne d'une augmentation du comportement dépressif. Cette augmentation n'a aucun effet au niveau de l'anxiété (Richardson-Jones et al., 2010). Cela confirme que ce sont les récepteurs postsynaptiques 5-HT_{1A} qui sont cruciaux dans les troubles de l'anxiété, constituant une cible thérapeutique de prédilection avec le développement de ligand 5-HT_{1A} pour traiter l'anxiété. Ainsi, le buspirone, appartenant à la famille des azapirones, a été l'un des premiers ligands 5-HT_{1A} pour traiter l'anxiété. Ce sont des agents psychoactifs qui ont des effets anxiolytiques.

🌀 Rôle dans la schizophrénie

Les récepteurs 5-HT_{1A} ont été étudiés dans le cadre de la schizophrénie (Bantick et al., 2001). Ainsi, des études d'autoradiographies, réalisées sur des prélèvements *post-mortem* de cortex préfrontal et d'hippocampe, ont montré une densité de récepteur 5-HT_{1A} plus élevée chez les patients schizophrènes en comparaison avec des cerveaux de sujets sains (Burnet et al., 1996, 1997). De plus, les récepteurs 5-HT_{1A} sont régulés de manière positive dans des modèles animaux de schizophrénie basés sur l'administration d'antagonistes non compétitifs des récepteurs NMDA (Wedzony et al., 1997). De plus, il est décrit que les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} augmentent la libération de dopamine dans le cortex préfrontal. Ces constats

permettent d'imaginer que de telles drogues peuvent atténuer les hypofrontalités métaboliques et la diminution de la transmission dopaminergique observées au niveau cortical chez le patient schizophrène (Weinberger et al., 2001). De la même manière, les agonistes 5-HT_{1A} diminuent l'effet comportemental et neurochimique induit par l'amphétamine (connue pour induire une hyperactivité du système dopaminergique subcortical et qui a été utilisée comme modèle pharmacologique de schizophrénie). L'utilisation d'antagonistes a aussi des effets dans la schizophrénie. Ainsi, les antagonistes 5-HT_{1A} peuvent réduire les déficits de mémoire de travail, révélés chez des modèles de rongeurs et de primates et observés cliniquement chez les patients schizophrènes (Sumiyoshi and al., 2008). Cependant, il est encore actuellement difficile de prouver que les effets des antagonistes et agonistes 5-HT_{1A} observés dans les modèles expérimentaux de schizophrénie peuvent être liés aux récepteurs situés dans le cortex préfrontal.

🌀 Rôle dans la cognition

De récentes études ont montré que le blocage des récepteurs 5-HT_{1A} provoque une augmentation de signal dans les circuits impliqués dans les processus cognitifs. Ceci suggère ainsi une nouvelle approche thérapeutique pour réduire les déficits cognitifs au cours du vieillissement ou dans le cadre de démences (Carli et al., 1997). En effet, les récepteurs 5-HT_{1A} sont présents en grandes quantités dans les hippocampes et interviennent dans les phénomènes de mémorisation. Des études ont montré que l'injection de 8-OHDPAT inverse les effets de détérioration expérimentale de la mémoire induite par la scopolamine (Carli et al., 1997). L'équipe de Schechter a montré que le lecozotan, antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{1A} avait des effets procognitifs. De plus, la détérioration expérimentale de la mémoire, à la fois de manière chimique mais aussi après lésion du système cholinergique dans l'hippocampe peut être renversé par l'injection de lecozotan (Schechter et al., 2005).

🌀 Rôle dans la dépression

De nombreuses études ont été consacrées à l'implication des récepteurs 5-HT_{1A} dans la physiopathologie de la dépression. L'une des premières études cliniques qui a étudié la relation entre la sérotonine et la dépression a révélé que la

concentration en 5-hydroxyindolacétate était diminuée dans le liquide céphalo-rachidien des patients dépressifs suicidés (Bertillon et al., 1974). Les travaux précliniques de Blier et de Montigny (Université de Mc Gill), ainsi que ceux d'Artigas et d'Adell (Université de Barcelone) ont permis de construire un mécanisme impliquant les autorécepteurs 5-HT_{1A}, consécutivement à l'augmentation de la quantité extracellulaire de 5-HT au décours du traitement antidépresseur (ciblé essentiellement sur le blocage du transporteur de la sérotonine). Ainsi, il est reconnu que l'activation des autorécepteurs 5-HT_{1A} du raphé diminue l'activité électrique du neurone et donc la libération de sérotonine au démarrage du traitement par un inhibiteur de recapture de la sérotonine (ISRS) (Blier and de Montigny, 1994 ; Adell and Artigas, 1991). L'activation initiale des autorécepteurs 5-HT_{1A} du noyau du raphé dorsal agirait donc comme un frein, en diminuant la libération de 5-HT dans les aires de projections sérotoninergiques, expliquant ainsi le délai d'action des antidépresseurs. En effet, bien que les ISRS rejoignent rapidement le cerveau et bloquent immédiatement la recapture de la sérotonine, il faut trois à quatre semaines pour que le traitement clinique soit efficace (Albert and Le Francois, 2010, pour revue). Ce délai est attribué au temps que mettent les autorécepteurs à se désensibiliser au contact de la 5-HT, diminuant ainsi leur rétrocontrôle négatif et laissant l'ISRS augmenter la neurotransmission sérotoninergique. Une étude récente a montré qu'une diminution de 30 % des autorécepteurs 5-HT_{1A} était suffisante pour que l'effet antidépresseur des ISRS soit plus rapide chez la souris (Richardson-Jones et al., 2010). Ce travail a « réactualisé » l'implication des autorécepteurs 5-HT_{1A} au décours d'un traitement antidépresseur, suggérant que la régulation négative de la transcription de l'ARNm des récepteurs 5-HT_{1A} pourrait être une cible pour la thérapeutique.

b) Les récepteurs 5-HT₇

La localisation cérébrale des récepteurs 5-HT₇ laisse présager que ces récepteurs sont impliqués dans des fonctions physiologiques du SNC. En effet, nous avons vu que les récepteurs 5-HT₇ étaient situés essentiellement dans le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe ou le cortex, suggérant un rôle dans le rythme

circadien, la thermorégulation, le sommeil, la dépression ou encore la mémorisation. Par ailleurs, nous avons vu que certains antidépresseurs (amytiripiline) et antipsychotiques (clozapine) avaient une forte affinité pour les récepteurs 5-HT₇. De même, des traitements chroniques avec divers antidépresseurs (fluoxétine, miansérine, imipramine, desipramine...) entraînent une diminution de la liaison sur les récepteurs 5-HT₇ (Mullins et al., 1999). À partir de ces observations préliminaires, différentes études précliniques ont été effectuées afin d'étudier le rôle des récepteurs 5-HT₇. Il est à noter que, par rapport aux récepteurs 5-HT_{1A}, très peu d'études cliniques ont été centrées sur les récepteurs 5-HT₇. Ceci s'explique notamment par le manque de recul des études expérimentales (récentes) et par le manque d'outils en pharmacologie et en imagerie, tel que nous allons l'aborder ultérieurement.

📍 Rôle dans la régulation des rythmes circadiens

Les premières études ont porté sur les récepteurs 5-HT₇ présents dans le noyau suprachiasmatique et qui ont suggéré un rôle dans l'horloge circadienne (Hedlund et al., 2005). Une injection d'antagoniste 5-HT₇, comme le SB269970 ou le SB656104, modifie l'architecture du sommeil de l'animal (Hagan et al., 2000 ; Thomas et al., 2003). De même, une étude avec des souris KO pour les récepteurs 5-HT₇ montre une réduction du temps passé en REM (Rapid Eye Movement) pendant la phase lumineuse sans affecter les autres phases de sommeil (Hedlund et al., 2005). Un autre effet médié par les récepteurs 5-HT₇ pour le rythme circadien concerne l'induction d'une phase de « remise à zéro » dans le noyau suprachiasmatique après injection de 8-OHDPAT (Lovenberg et al., 1993). L'effet 5-HT₇ est démontré par l'inhibition provoquée par l'injection de SB269970 ou encore de DR-4004, antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT₇ (Ehlen et al., 2001 ; Sprouse et al., 2004 ; Kikuchi et al., 1999).

📍 Rôle dans la dépression et l'anxiété

Les tests comportementaux, tels que le « Forced Swimming Test » (FST) ou encore le « Tail Suspension Test » (TST) sont des tests classiquement utilisés pour évaluer le potentiel antidépresseur d'une drogue ou pour évaluer le phénotype d'un modèle animal de la dépression (Cryan et al., 2002 ; Cryan and Holmes, 2005).

Certaines études ont porté sur le blocage pharmacologique des récepteurs 5-HT₇ pendant la réalisation de ces tests. Le blocage pharmacologique et l'inactivation génétique des récepteurs 5-HT₇ (souris KO) diminuent l'immobilité des souris dans ces tests, suggérant un effet antidépresseur (Hedlund et al., 2005 ; Guscott et al., 2005 ; Bonaventure et al., 2007 ; Wesolowska et al., 2006 (a,b), 2007). De plus, certaines équipes ont démontré un effet synergique entre une faible dose de SB269970 et un traitement antidépresseur à base d'ISRS, conduisant à une réduction de l'immobilité, à la fois dans le test du FST et du TST (Bonaventure et al., 2007 ; Wesolowska et al., 2007). L'amisulpride, considéré comme un antipsychotique atypique, a une forte affinité pour les récepteurs 5-HT₇ et son efficacité aux tests de FST et de TST chez les souris sauvages 5-HT₇ (mais pas KO 5-HT₇^{-/-}) montre que son action est liée à la présence de récepteurs 5-HT₇ fonctionnels *in vivo* (Abbas et al., 2009). Les récepteurs 5-HT₇ ont aussi une action sur l'anxiété et les troubles obsessionnels compulsifs. Ainsi, le test d'enfouissement de billes de verres est utilisé pour modéliser l'anxiété d'un animal. Une étude a montré que le blocage réalisé, soit en utilisant un blocage pharmacologique des récepteurs 5-HT₇, soit des souris KO 5-HT₇^{-/-}, montre une diminution du nombre de billes enfouies (Hedlund and Sutcliffe, 2007). Dans un test d'anxiété tel que le « labyrinthe en croix surélevé », l'injection de SB269970 a un effet anxiolytique, alors que les souris KO 5-HT₇^{-/-} présentent le même phénotype que les souris sauvages (Hagan et al., 2000 ; Wesolowska et al., 2006 a, b).

🌀 Rôle dans la pathologie migraineuse

La présence des récepteurs 5-HT₇ dans les vaisseaux sanguins a également orienté les études vers la physiopathologie de la migraine. En effet, les récepteurs 5-HT₇ seraient impliqués dans la dilatation de l'artère carotide induite par la sérotonine et faisant suite au blocage des récepteurs 5-HT_{1B/1D}. L'injection de SB269970 bloque cette vasodilatation chez l'animal (Terron and Martinez-Garcia, 2007). De plus, les triptans utilisés en thérapeutique pour traiter les migraines semblent avoir une bonne affinité pour les récepteurs 5-HT₇ (Villalon et al., 1997).

Rôle dans la douleur

Des études récentes ont aussi montré que les récepteurs 5-HT₇ pourraient intervenir dans le traitement des douleurs neuropathiques du fait de leur présence au niveau de relais centraux dans les voies de la nociception. Cette étude faite sur des rongeurs montre que si le blocage des récepteurs 5-HT₇ avec le SB269970 n'a aucun effet sur la douleur, la stimulation des récepteurs 5-HT₇ avec l'agoniste spécifique, AS-19, entraîne en revanche une diminution dose-dépendante de l'allodynie/hyperalgésie ([Bourgoin et al., 2008](#)). Une autre étude a démontré que l'injection intrathécale de SB269970 inhibe l'effet analgésique de la morphine suggérant que l'effet antinociceptif est médié par les récepteurs 5-HT₇ ([Dogrul and Seyrek, 2009](#)).

Pour finir, les récepteurs 5-HT₇ ont aussi un rôle dans la régulation de la température corporelle. En effet, l'injection de SB269970 inhibe l'hypothermie induite par l'administration de 5-CT ou de 8-OHDPAT ([Faure et al., 2006](#)). Chez les souris KO 5-HT₇^{-/-} l'injection de 5-CT ou de 8-OHDPAT n'induit pas d'hypothermie, ce qui confirme l'implication des récepteurs 5-HT₇ dans ce phénomène ([Hedlund et al., 2003](#)). Enfin, il est à noter que les récepteurs 5-HT₇ semblent aussi impliqués dans l'autisme et l'épilepsie. Cependant moins d'arguments expérimentaux sont disponibles à l'heure actuelle ([voir Hedlund, 2009 pour revue](#)).

III) LES BIOMARQUEURS TEP

1) Définitions des biomarqueurs

Les biomarqueurs sont des paramètres physiologiques, biochimiques ou moléculaires quantifiés et évalués comme des indicateurs, soit de processus biologiques, normaux ou pathologiques, soit de réponses pharmacologiques résultant d'une intervention thérapeutique ([Biomarkers Definitions Working Group, 2001](#) ; [Vasan, 2006](#)). Les biomarqueurs peuvent être des métabolites, des protéines, des récepteurs, voire des images. L'intérêt pour ces biomarqueurs est croissant, tant pour la découverte et le développement de nouveaux médicaments en recherche translationnelle, que pour le suivi des patients et la médecine personnalisée. En effet, ils permettent une fiabilité accrue du criblage des médicaments candidats, l'accélération du développement, l'identification de répondeurs et l'optimisation du suivi thérapeutique. Ils peuvent également être des indicateurs de « traits » de la maladie (ou marqueurs des risques), des états pathologiques ou de la progression de la maladie ([Quinones and Kaddurah-Daouk, 2009](#)). Les biomarqueurs biochimiques ou génétiques peuvent être mesurés dans des échantillons biologiques comme le sang, l'urine ou la salive ([Harrigan, 2002](#) ; [Kaddurah-Daouk et al., 2008, 2009](#) ; [Lindon et al., 2004](#) ; [Kristal and Shurubor, 2005](#)).

Cependant, beaucoup de molécules candidates s'avèrent être de mauvais biomarqueurs. Il est en effet possible que le biomarqueur n'intervienne pas directement dans les voies de signalisation de la physiopathologie de la maladie, ou encore dans les voies de signalisation de la réponse pharmacologique. La recherche en biomarqueur est donc cruciale et nécessite d'avoir une validation rigoureuse.

Un biomarqueur validé est un biomarqueur qui a été mesuré dans un test analytique bien établi et pour lequel il y a des résultats scientifiques qui élucident la physiologie, la toxicologie, la pharmacologie et la clinique.

2) Les biomarqueurs en neurologie et en psychiatrie

La recherche de biomarqueurs en neurologie et en psychiatrie est indispensable pour comprendre la physiopathologie, poser des diagnostics, valider une cible thérapeutique ou suivre l'efficacité d'un traitement neuropharmacologique. La première contrainte en neurosciences est que les biomarqueurs nécessitent l'accès à l'organe le plus inaccessible : le cerveau. À la difficulté d'accès à des biopsies cérébrales ou à des prélèvements de LCR (invasifs) s'ajoute la complexité des mécanismes moléculaires et neurochimiques sous-tendant les fonctions cérébrales.

Dans le domaine de l'exploration du système nerveux central, les biomarqueurs sont également classés selon qu'il s'agit de marqueurs génétiques, biochimiques, de neuroimagerie, voire de paramètres cliniques ([Dekosky and Marek, 2003](#)). Ces marqueurs utilisés en clinique permettent de quantifier la perte d'une fonction ou de l'évolution de la maladie. À titre d'exemple, des biomarqueurs « cognitifs » permettent d'évaluer la mémoire dans la maladie d'Alzheimer ([Dekosky, 2008](#)) ou encore la perte de l'odorat dans la maladie de Parkinson ([Herting et al., 2008](#)). Cependant, il est difficile d'avoir des biomarqueurs en utilisation clinique de routine du fait de la variété des symptômes et de leur absence de spécificité ou de sensibilité ([Haehner et al., 2007](#)). Les biomarqueurs en neuroimagerie sont des compléments potentiels aux données cliniques pour l'évaluation des troubles dans le système nerveux central comme dans la maladie d'Alzheimer ([Jagust, 2004 pour revue](#)) mais aussi des moyens pour évaluer l'action d'un nouveau médicament agissant sur le cerveau ([Borsook et al., 2006](#)). Les biomarqueurs peuvent fournir des informations pour le diagnostic, mais aussi le pronostic de la maladie, utilisables au stade précoce de la maladie (diagnostic précoce, diagnostic différentiel) mais aussi tout au long de sa progression (réponse à une thérapeutique).

Les progrès en imagerie apportent des outils pour l'exploration fonctionnelle du cerveau (MEG, TEP, IRM) dont la complémentarité peut être mise à profit. Dans ce contexte, l'imagerie en tomographie par émission de positons (TEP) permet l'exploration de la chimie cérébrale *in vivo*, grâce à des radiopharmaceutiques qui sont autant de biomarqueurs potentiels de la neurotransmission entre autres.

IV) L'imagerie TEP

1) Principe général

La tomographie par émission de positon ou TEP est apparue vers la fin des années 1970 avec les premières molécules marquées au fluor 18 et avec la construction des premières caméras TEP. La TEP est une technique d'imagerie médicale fonctionnelle qui consiste à injecter un traceur émetteur de positon à un patient. Ces positons produisent des photons qui sont détectés par la caméra TEP. Ce traceur est constitué d'un vecteur moléculaire, dirigé vers une cible moléculaire, et d'un isotope radioactif émetteur de positon permettant de visualiser la distribution de la molécule au sein de l'organisme (De Dreuille et al., 2002 ; Gosseries et al., 2008). La TEP permet d'accéder chez le patient à des mesures quantitatives de paramètres biochimiques comme des densités de récepteurs, de transporteurs ou d'enzymes (Pike, 2009 pour revue).

2) Principes physiques et instrumentaux

L'imagerie TEP, comme son nom l'indique, utilise les atomes émetteurs de positons liés à des vecteurs moléculaires.

Les émetteurs de positons sont caractérisés par un excès de charges positives dans leur noyau. Ils se désintègrent vers un état stable par transformation d'un positon (p^+) en un neutron, conduisant à l'émission d'un neutrino et d'un positon. Le positon est aussi appelé anti-matière ou e^+ . Il est de même masse que l'électron e^- mais de charge opposée. La rencontre dans la matière entre un positon et un électron provoque une réaction d'annihilation qui se traduit par la production de deux photons de 511keV émis dans la même direction mais de sens opposé. Le positon peut parcourir seulement une faible distance dans la matière (de l'ordre de quelques millimètres) et perd toute son énergie cinétique. Cependant, des défauts de colinéarité peuvent être observés si le positon qui rentre en contact avec un électron n'a pas perdu toute son énergie cinétique (Figure 14).

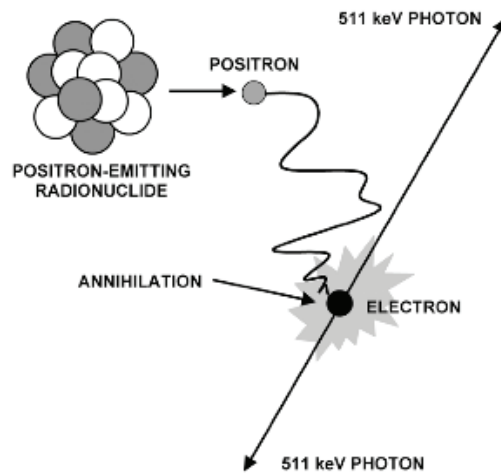


Figure 14 : Schéma représentant l'annihilation entre un positon et un électron produisant deux photons de 511KeV (d'après Phelps, 2006).

C'est cette annihilation qui est détectée par la caméra TEP ou tomographe. Le tomographe est constitué de plusieurs parties (Bailey et al., 1998). Les scintillateurs (ou cristaux) sont disposés en couronne et ont pour but d'arrêter les rayonnements β et de produire des photons de scintillation. Ces photons sont ensuite captés par la dernière partie de la caméra, les photomultiplicateurs, qui vont les transformer en signal électrique transmis aux systèmes informatiques. Des algorithmes permettent ensuite la reconstruction de l'image (Figure 15).

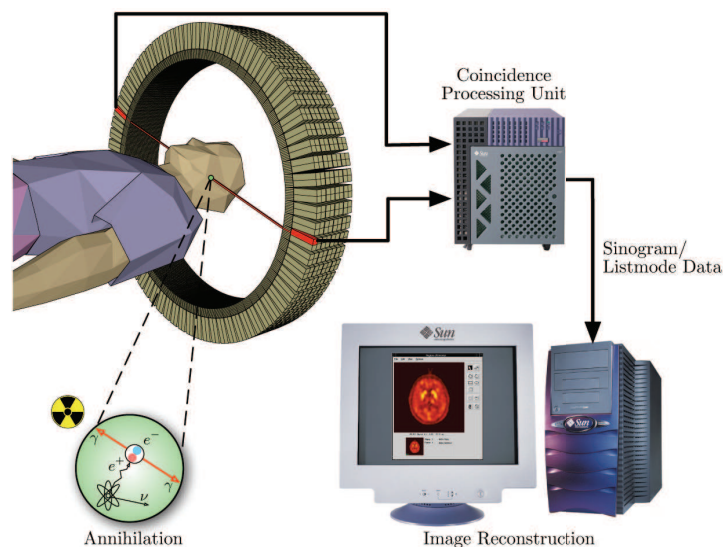


Figure 15 : Schéma simplifié de la création des deux photons gamma de 511KeV qui sont ensuite détectés par la caméra TEP et ensuite transformés en signal électrique pour pouvoir être transformés par des algorithmes, analysés sur un ordinateur et transformés en image (Source : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:PET-schema.png>).

3) Les radiotraceurs TEP

a) Les différents types d'isotopes émetteurs de positons

Il y a différents types d'isotopes émetteurs de positons. En effet, on peut les classer en trois catégories selon leur période radioactive (T) (correspondant à la durée au cours de laquelle la moitié de la radioactivité s'est désintégrée) :

- 1) les isotopes TEP à demi-vie courte, comme l'oxygène (^{15}O T : 2min), l'azote (^{13}N T : 10min) et le carbone (^{11}C T : 20min) ;
- 2) les isotopes TEP à demi-vie longue comme le fluor (^{18}F T : 120min) et le brome (^{76}Br T : 16h) ;
- 3) les isotopes TEP à demi vie très longue comme le germanium (^{68}Ge T : 271 jours) ou encore le sodium (^{22}Na T : 2,6ans).

En imagerie TEP, nous nous intéresserons aux deux premières catégories d'émetteur de positons.

b) Production du radiotraceur

La première étape de production d'un radiotraceur est la synthèse du précurseur. Il s'agit d'une molécule d'intérêt à laquelle un groupe « partant » est inséré pour réaliser le radiomarquage. Différents isotopes radioactifs sont utilisés pour réaliser les radiomarquages. La présence de carbone et d'hydrogène au sein de tous les composés organiques facilite l'insertion d'un carbone 11. L'insertion d'un atome de fluor, atome plus gros stériquement est plus délicat car, de par sa taille et son électronégativité, il peut provoquer un encombrement stérique, une modification de la distribution des charges et donc entraîner une modification de la lipophilie ou encore de l'affinité de la molécule. Cependant, les marquages au fluor 18 sont préférés du fait de la longue demi-vie du fluor 18.

La seconde étape de production de radiotraceur est la production d'isotope radioactif à incorporer dans le vecteur d'intérêt. Pour cela, il faut utiliser un accélérateur de particules ou cyclotron. Cet accélérateur de particules, inventé

par Ernest Orlando Lawrence en 1931, utilise l'action combinée d'un champ électrique et d'un champ magnétique afin d'accélérer et de confiner les particules dans un espace restreint (Figure 16). Les particules suivent une trajectoire circulaire et sont accélérées dans le champ électrique alternatif produisant des faisceaux de protons et de deutons à des énergies de 18 à 39 MeV (très inférieures aux énergies de la physique nucléaire). Le cyclotron du CERMEP (IBA 18/9 cyclone, Ion Beam Application, Louvain-la-Neuve, Belgique) permet d'obtenir quatre isotopes obtenus en irradiant une cible avec les protons accélérés ; il s'agit du ^{18}F , ^{15}O , ^{13}N et ^{11}C .

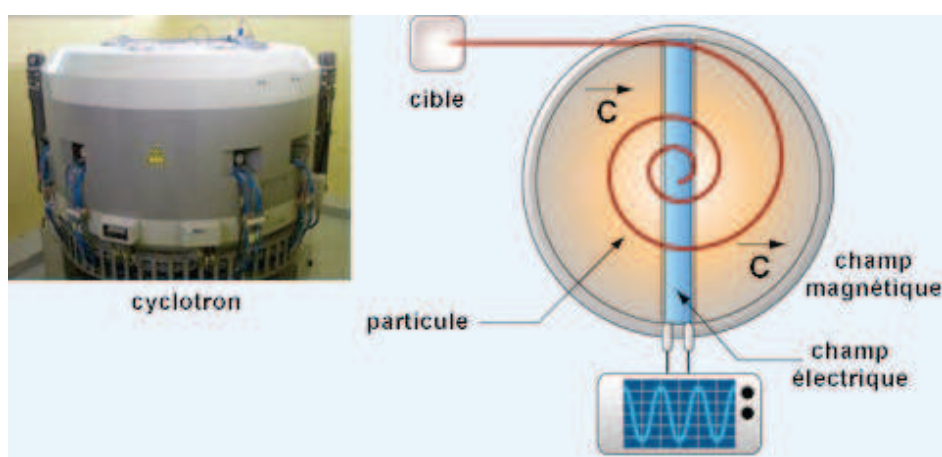


Figure 16 : Cyclotron et représentation schématique de son fonctionnement. (Source : <http://www.cyroi.fr/spip.php?rubrique13>).

L'isotope radioactif obtenu est transféré, via des colonnes blindées et sous flux d'azote, dans un automate de synthèse afin d'éviter, autant que possible, l'intervention humaine (car les quantités radioactives sont très élevées à ce stade) et d'assurer la reproductibilité des rendements de synthèses (Figure 17). Pour nos synthèses, le précurseur est solubilisé dans un solvant organique, le DMSO. Le mélange [DMSO-précurseur-isotope] est chauffé pendant 10 min à 150°C (radiomarquage) puis passe sur une colonne C18 qui va piéger la molécule radiomarquée. Plusieurs étapes de chromatographie éliminent les excès de fluorure. La molécule suit ensuite un contrôle de qualité en HPLC analytique et peut ensuite être préparée en chambre stérile pour injection en suivant les bonnes

pratiques de fabrication de médicament de la Pharmacopée. La durée totale de préparation d'un radiotraceur, comprenant sa synthèse, sa purification, son contrôle qualité et sa mise en forme injectable ne doit classiquement pas excéder 3 demi-vies, durée au delà de laquelle l'utilisation est difficile car il y a une baisse de la radioactivité et de l'activité spécifique. Cela est d'autant plus important pour les isotopes à faible demi-vie comme le Carbone 11.

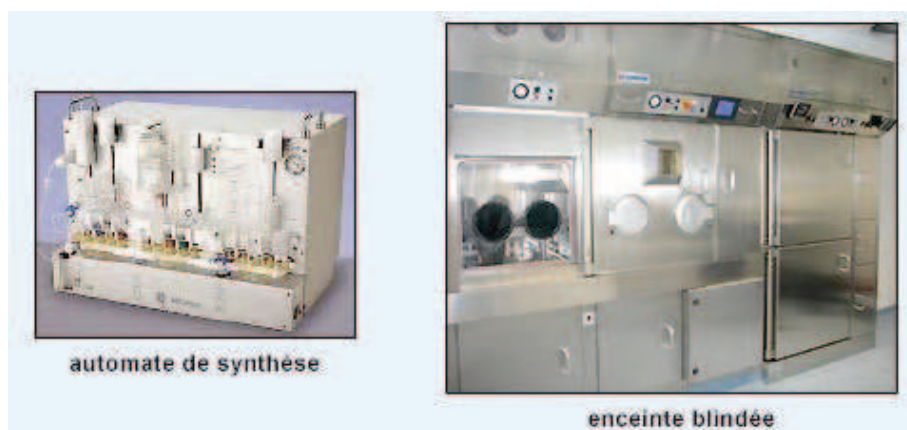


Figure 17 : Automate de synthèse et cellules blindées dans lesquelles se font les radiosynthèses. (Source : <http://www.cyroi.fr/spip.php?rubrique13>).

c) Les prérequis d'un radiopharmaceutique

Malgré des données *in vitro* favorables, celles-ci ne préjugent pas de l'utilisation *in vivo* de la molécule comme radiotraceur TEP. Au-delà du passage de conditions d'utilisation *in vitro* à des conditions *in vivo*, il faut tenir compte du fait qu'un radiotraceur est injecté à des doses « traceuses », c'est-à-dire des concentrations infra-pharmacologiques (quelques dizaines de μg en dose pondérale au lieu des quelques mg fréquemment utilisés dans des approches pharmacologiques classiques). En effet, on ne cherche qu'à « tracer » le cheminement et le marquage du récepteur par la molécule radioactive, et non à provoquer une activation ou encore un blocage de ce récepteur en occupant un pourcentage important de ce dernier.

Ainsi, plusieurs conditions spécifiques doivent être réunies pour faire d'une molécule candidate un bon radiotraceur TEP (Halldin et al., 2001 ; Laruelle et al., 2003 ; Pike et al., 2009).

- La molécule candidate doit avoir une structure chimique compatible avec le radiomarquage, c'est-à-dire, l'ajout d'un isotope radioactif. La réaction la plus utilisée pour le radiomarquage est la substitution nucléophile (fluor 18) ou la méthylation (carbone 11). Il faut donc que le précurseur puisse avoir chimiquement un « groupe partant » permettant ces réactions (un groupe -nitro pour la fluoration).

- La molécule doit présenter une lipophilie adéquate (classiquement un log P entre 1 et 4, selon [Waterhouse et al., 2003](#)), lui permettant un passage de la BHE. En cas de lipophilie trop élevée, la molécule se fixera de manière non spécifique sur les lipides membranaires et ne passera pas la BHE.

- L'affinité et la spécificité *in vivo* de la molécule vis-à-vis des récepteurs visés doivent rester élevées après le radiomarquage afin d'avoir une interaction ligand-récepteur stable et pour une seule cible moléculaire.

- La molécule radiomarquée doit avoir une haute activité spécifique (pour pouvoir être injectée à dose traceuse).

- La fixation non spécifique doit être minimale, de manière à ce que le rapport « signal sur bruit » soit satisfaisant en termes d'imagerie.

- Le potentiel de liaison (*BP*) représentant une mesure combinée entre la densité de récepteur disponible (*Bmax*) et l'affinité du ligand (*Kd*) pour ce récepteur doit se situer entre 2 et 20 pour un radiotraceur correct.

- Le radiotraceur doit permettre d'obtenir des cinétiques d'équilibre compatibles avec la durée d'acquisition (entre 30 min et 1h30). En effet, le traceur doit atteindre la concentration maximale (*Cmax*) rapidement et rester à l'état d'équilibre pendant un temps suffisant pour obtenir des potentiels de liaison à l'équilibre.

- La dégradation de la molécule *in vivo* ne doit pas (ou peu) aboutir à des métabolites radioactifs passant la BHE. La radioactivité inhérente à ces métabolites n'est pas discriminée par la caméra ([Pike, 2009 pour revue](#)). Les métabolites radioactifs ou non, ne doivent pas non plus rentrer en compétition avec le traceur pour les cibles d'intérêts.

- La molécule doit être le moins possible un substrat de la glycoprotéine P (PgP). En effet, la PgP agit comme une pompe d'efflux dans la membrane de la

BHE et peut relarguer le radiotraceur (Elsinga et al., 2004 ; Passchier et al., 2000 ; Pike, 2009 pour revue).

- Enfin, la molécule doit être, de préférence, un antagoniste (car la fixation au récepteur est plus stable que celle d'un agoniste).

V) L'imagerie TEP des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A}

À l'heure actuelle, il existe un nombre assez important de radiotraceurs pour l'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A} (Pike et al., 2001 ; Halldin et al., 2001 ; Kumar and Mann, 2007). Cependant, il est à relever que ces radiotraceurs sont quasi-exclusivement des antagonistes (et la grande majorité des radiopharmaceutiques TEP actuellement utilisés en clinique pour visualiser les récepteurs 5-HT_{1A} sont des antagonistes). Ils se fixent donc, à la fois, sur les récepteurs à haute affinité couplés aux protéines G et sur les récepteurs dits à basse affinité, non-couplés aux protéines G.

Les radiotraceurs TEP développés comme antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} ont été les suivants :

[¹¹C]WAY100635 :

Le [¹¹C]WAY100635 est le radiotracer le plus utilisé (96 publications dans Pubmed, consulté en janvier 2011) avec un K_d de 0,2-0,4nM pour les récepteurs 5-HT_{1A} et une très faible affinité pour les autres récepteurs 5-HT. Cependant, il a une affinité non négligeable pour les récepteurs D4 avec un K_d de 2,4nM (Chemel et al., 2006 ; Martel et al., 2007). Sa synthèse a été mise au point par l'équipe de Wilson à Toronto avec une activité spécifique initiale de 33GBq/μmole (Wilson et al., 1998). Le WAY100635 avait déjà été étudié chez la souris, le rat et l'homme par un marquage au tritium. Sa distribution était comparable à celle du 8-OHDPAT tritié (agoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{1A}). Dans un premier temps, le WAY100635 a été marqué sur le groupement O-méthyl. Cependant, il produisait un métabolite lipophile, le (O-méthyl-¹¹C) WAY100634, passant la BHE et augmentant le marquage non spécifique. L'équipe de Pike a modifié la chimie de synthèse afin d'avoir un radiomarquage sur le carbone pour obtenir le [¹¹C]WAY100635. Il est à noter que le marquage au WAY100635 est insensible au changement de concentration en sérotonine endogène.

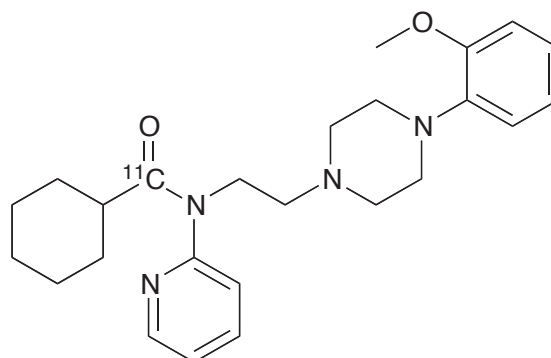


Figure 18 : Structure chimique du $[^{11}\text{C}]\text{WAY100635}$. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphényl-pipérazine ; amino-pyridine ; cyclohexylcarboxamide).

[carbonyl- ^{11}C]DWAY :

Il s'agit d'un métabolite du $[^{11}\text{C}]\text{WAY100635}$ apparaissant après son injection à l'homme (Pike et al., 1998). Il y a peu d'informations à son sujet. En effet, ni le K_d ni le B_{max} n'ont pu être déterminés et seul l' IC_{50} de 1,4nM est connue (Maiti et al., 2005). Une équipe de l'université de Détroit a mis au point la synthèse automatisée de ce radioligand permettant d'obtenir une pureté radiochimique de 99% ainsi qu'une activité spécifique très haute de 133,2-185GBq/ μmole (Maiti et al., 2005). Il présente des caractéristiques TEP favorables avec une bonne perméabilité de la BHE, une clairance favorable et un signal radioactif supérieur au WAY100635 à quantité égale. Cependant, cette synthèse est peu compatible avec une activité de routine (étapes multiples et longues) et avec un rendement très faible.

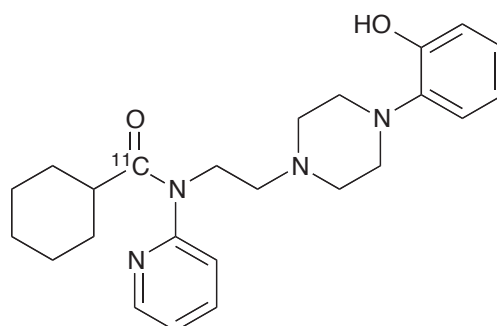


Figure 19 : Structure chimique du [carbonyl- ^{11}C]DWAY. (Groupements chimiques principaux : hydroxyphényl-pipérazine ; amino-pyridine ; cyclohexylcarboxamide)

[¹⁸F]FPWAY :

Des molécules fluorées ont été synthétisés car les deux problèmes majeurs inhérents au WAY10035 sont le marquage au carbone 11, donc la faible période radioactive, et son métabolisme rapide. Lors des études initiales cherchant à trouver des analogues du WAY100635, deux molécules ont été identifiées. Il s'agit du FBWAY et du FPWAY marqués dans un premier temps au carbone 11 et présentant des résultats prometteurs en TEP (Ma et al., 2002). Les molécules marquées au carbone 11 montraient un bon rendement radiochimique, ainsi qu'une distribution cérébrale en accord avec la distribution des récepteurs 5-HT_{1A} avec un ratio signal sur bruit intéressant pour le [¹¹C]FPWAY. Ceci a justifié son radiomarquage au fluor 18. L'équipe d'Eckelman a réalisé sa synthèse en 2002 en obtenant une pureté radiochimique de 99% ainsi qu'une activité spécifique de 37GBq/μmole (Ma et al., 2002). Les premières études TEP de ce traceur ont montré une distribution cérébrale en accord avec les récepteurs 5-HT_{1A} et peu de défluorination *in vivo*. Cependant, il produit des métabolites radioactifs lipophiles dans le plasma ce qui limite son utilisation en TEP.

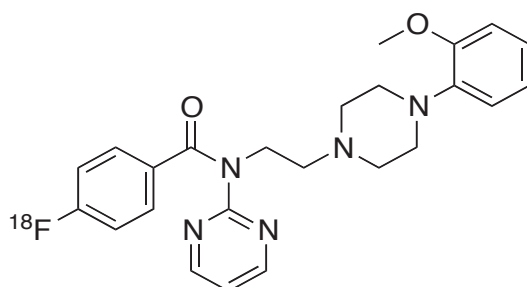


Figure 20 : Structure chimique du [¹⁸F]FPWAY. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphényl-pipérazine ; amino-pyrimidine ; 4 fluorobenzamide)

Dérivés du [¹⁸F]FCWAY :

L'équipe d'Eckelman à Bethesda a synthétisé cinq dérivés fluorés du WAY100635 (Lang et al., 1999). L'un d'entre eux, le FCWAY, existe sous une conformation trans et l'autre sous une conformation cis. Le (4-trans-¹⁸F)FCWAY, a une haute affinité pour les 5-HT_{1A} avec un K_i de 0,25nM ainsi que de très bon ratio hippocampe sur cervelet. Le [¹⁸F]3-cis-FCWAY, a une plus faible affinité (1,2nM) ainsi qu'une

pharmacocinétique plus rapide. Il subit moins de défluoration que tous les analogues FCWAY chez les rats et l'homme (Lang et al., 1999). Le fait qu'il subisse moins de défluoration est intéressant car cela limite le bruit de fond dû au fluor se fixant dans les os. Cependant, le [^{18}F]3-cis-FCWAY n'est pas utilisé en TEP du fait de sa plus faible affinité.

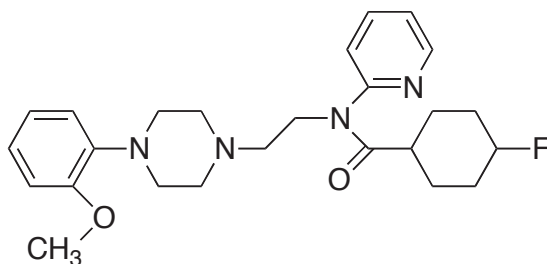


Figure 21 : Structure chimique du [^{18}F]FCWAY. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphénylpipérazine ; amino-pyridine ; 4-fluorocyclohexylcarboxamide).

[^{18}F]MPPF :

Comme le WAY100635 il s'agit d'un antagoniste compétitif et réversible avec une bonne sélectivité pour les 5-HT_{1A}, se fixant à la fois sur les autorécepteurs et les hétérorécepteurs et possédant une haute affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A} avec un K_d de 0,34nM (Schiue et al., 1997). Sa radiosynthèse, optimisée en une étape en 1998, est réalisée grâce à une réaction de substitution nucléophile (Le Bars et al., 1998). Le [^{18}F]MPPF serait sensible aux variations de sérotonine endogène mais dans des conditions pharmacologiques et non physiologiques. Le [^{18}F]MPPF est un substrat de la PgP. Ainsi, seulement 0,05% de la dose injectée passe dans le cerveau contrairement à 0,46% pour le WAY100635. (Aznavour et Zimmer, 2007).

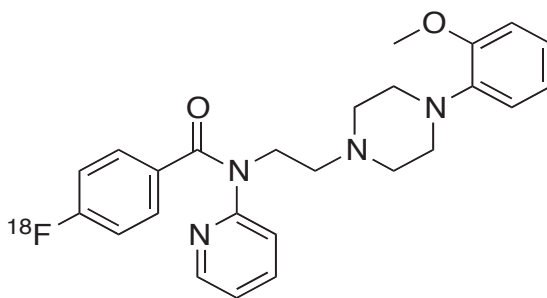


Figure 22 : Structure chimique du [^{18}F]MPPF. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphénylpipérazine ; amino-pyridine ; 4-fluorobenzamide).

[¹¹C]CPC222 :

Il s'agit d'un autre dérivé du WAY100635. Les premières images en TEP montrent un marquage spécifique dans l'hippocampe par rapport au cervelet chez l'homme et le rat. Cependant, il a une cinétique d'accumulation plus lente que le WAY100635 (Houle et al., 1997) et n'a pas été davantage étudié.

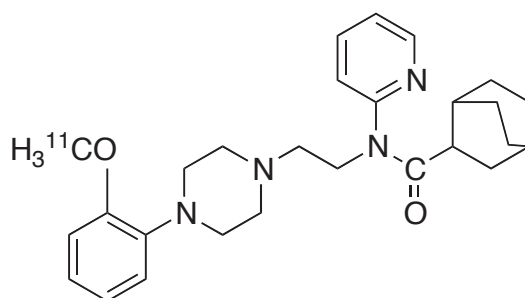


Figure 23 : Structure chimique du [¹¹C]CPC222. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphényl-pipérazine ; amino-pyridine ; bicyclo-octane carboxamide).

[¹¹C](R)R-WAY :

C'est un analogue du WAY100635 donc la principale amélioration par rapport à ce dernier serait une diminution de son métabolisme (Mc Carron et al., 2007 ; Zhang et al., 2007). Il se fixe sur les récepteurs 5-HT_{1A} et peut être déplacé par le WAY100635. Cependant, il semble être sensible à la Pgp (Liow et al., 2007). De plus, les résultats chez l'homme sont différents de ceux qui sont obtenus chez le singe (Yasuno et al., 2006). En effet, la cinétique de fixation dans le cerveau humain est trop lente, probablement à cause d'un métabolite radioactif lipophile que l'on ne retrouve pas chez le singe.

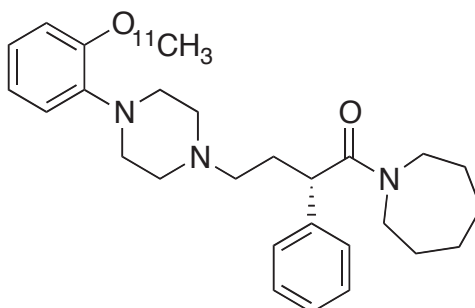


Figure 24 : Structure chimique du [¹¹C](R)-RWAY. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphényl-pipérazine ; azépame).

[¹⁸F]MeFWAY :

Il s'agit d'un autre analogue du WAY100635 avec une affinité comparable et une spécificité pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Il a d'avantage été testé que la plupart des traceurs précédents. Il a l'avantage de présenter peu de défluoration. Dans les expériences *in vitro*, on peut observer une fixation dans les régions riches en récepteurs 5-HT_{1A} comme l'hippocampe, le cortex et peu de marquage dans le cervelet, région pratiquement dépourvue de récepteurs 5-HT_{1A} (Saigal et al., 2006). Malgré ses résultats et une activité spécifique obtenue après le radiomarquage comprise entre 74 et 111GBq/μMol, sa synthèse en 4 étapes est trop lourde pour une utilisation en routine (Saigal et al., 2006). Seules les études chez le primate non humain ont été effectuées.

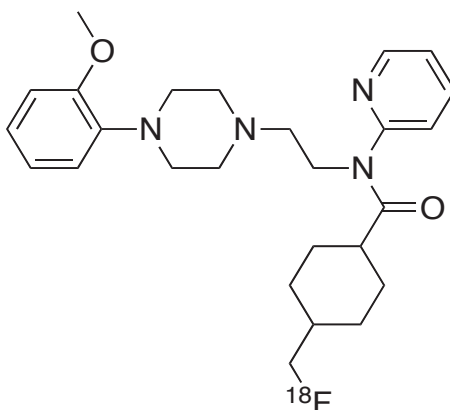


Figure 25 : Structure chimique du [¹⁸F]MeFWAY. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphényl-pipérazine ; amino-pyridine ; 4-fluorométhyl-cyclohexyl carboxamide).

[¹¹C] Nad-299 :

Cette molécule est initialement un antidépresseur présentant une très forte affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A}, avec un K_d de 0,17nM et une lipophilie favorable à un passage cérébral (Sandell et al., 1999). Chez le singe, il a une accumulation rapide dans le cerveau, avec une liaison maximale au bout de 10 min et une localisation dans les aires 5-HT_{1A} (hippocampe, noyau du raphé, néocortex) résultat confirmé chez l'homme. Sa cinétique est cependant trop rapide, ne

permet pas d'obtenir un temps d'acquisition suffisant et a été la cause de son arrêt.

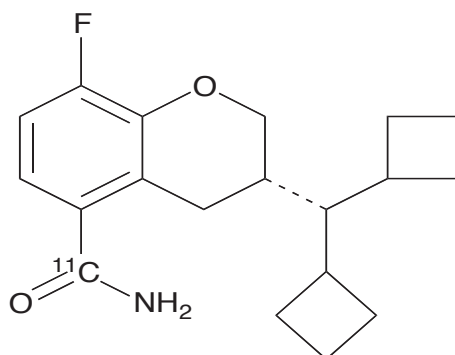


Figure 26 : Structure chimique du [^{11}C]NAD-299. (Groupement chimique principal : chromane).

Il apparaît à la lecture de cette liste que de nombreux antagonistes ont été développés (mais seuls deux sont couramment utilisés en protocoles de recherche clinique : le [^{18}F]MPPF et le [^{11}C]WAY100635).

Par contre, si le développement de radiotraceurs TEP aux propriétés d'agoniste 5-HT_{1A} a été tenté par plusieurs équipes (Pike et al., 2001 pour revue), il a très peu été couronné de succès.

Les quelques molécules suivantes sont les agonistes 5-HT_{1A} qui ont été testés en imagerie TEP.

[^{11}C]LY274601 :

Le LY274601 est un analogue du 8-OHDPAT. Il est aussi appelé 8-SMeDPAT. Il présente une bonne affinité pour les 5-HT_{1A} avec un Ki de 0,6nM. D'un point de vue chimique, son radiomarquage est assez rapide (30min) et son activité spécifique est de l'ordre de 600mCi/μmol. Les premières études *in vivo* chez la souris ont montré un marquage dans les régions riches en récepteurs 5-HT_{1A}, mais il y a aussi un marquage dans les régions dépourvues de récepteurs 5-HT_{1A} comme le cervelet. Ce marquage non spécifique, ainsi que sa métabolisation et son relargage trop rapide en font un traceur non utilisable pour l'imagerie TEP des récepteurs 5-HT_{1A} (Suehiro et al., 1998).

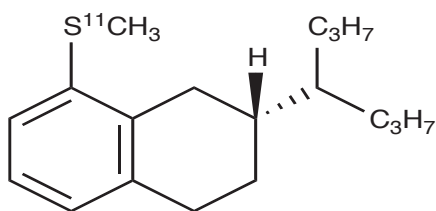


Figure 27 : Structure chimique du [^{11}C]LY274601. (Groupement chimique principal : tétraline).

[^{11}C]méthoxyphényle-thiochromane :

Cette molécule a une affinité de 0,5 nM pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Il s'agit d'un agoniste au niveau présynaptique et d'un antagoniste au niveau postsynaptique. Le marquage de cette molécule au carbone 11 a été réalisé avec succès. En effet, la synthèse permet d'obtenir une pureté radiochimique supérieur à 99% ainsi qu'une activité spécifique comprise entre 2,5 et 3,6 $\mu\text{Ci/mol}$. Les expériences *in vivo* ont été réalisées sur deux modèles animaux. Une première série d'expérience a été réalisée chez le rat avec une sonde intracérébrale radiosensible et une deuxième chez le chat éveillé par examen TEP. Les deux expériences montrent un bon passage de la barrière hématoencéphalique mais pas de marquage spécifique dans les régions 5-HT_{1A}, conduisant donc à son abandon (Zimmer et al., 2003).

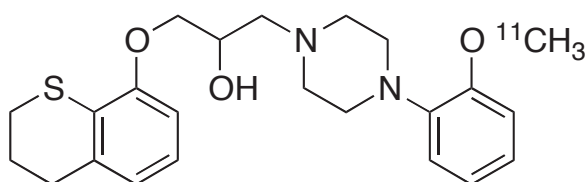


Figure 28 : Structure chimique du [^{11}C]méthoxyphényle-thiochromane. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphényl-pipérazine ; thiochromane).

[^{11}C]MPT :

Le [^{11}C] MPT est un agoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A} avec un K_i de 1,36 pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Il présente une lipophilie favorable à son passage de la BHE avec un log de P de 1,8. Sa synthèse en cinq étapes conduit à une pureté

radiochimique de 99% ainsi qu'une activité spécifique de l'ordre de 55,5TBq/mmol (Cheng et al., 2007). Cependant, les études *in vivo* chez le babouin montrent que malgré un bon passage dans le cerveau, le relargage est trop lent et les fractions libres non mesurable dans le plasma le rendent inutilisable en TEP (Cheng et al., 2007).

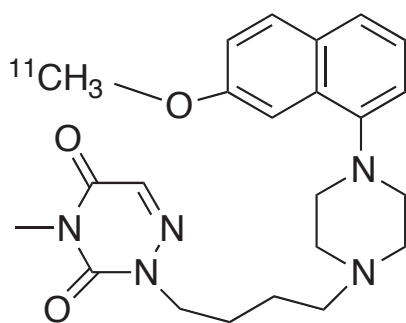


Figure 29 : Structure chimique du [^{11}C]MPT. (Groupements chimiques principaux : méthoxynaphtyl-pipérazine ; triazine-dione).

[^{11}C]MMT :

Le [^{11}C]MMT est l'analogue 3-méthoxyphenyl du [^{11}C]MPT. Celui-ci a une bonne affinité ainsi qu'une bonne sélectivité vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A} avec une EC₅₀ comparable à celle de la sérotonine. Des études préliminaires chez le babouin montrent que le traceur pénètre bien la BHE mais avec un faible marquage spécifique des récepteurs 5-HT_{1A} ainsi qu'une clairance trop rapide. Il est donc inutilisable en imagerie TEP pour quantifier les récepteurs 5-HT_{1A} (Prabhakaran et al., 2006).

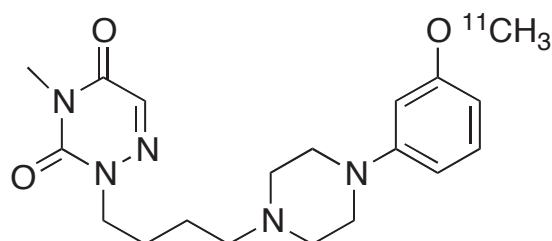


Figure 30 : Structure chimique du [^{11}C]MMT. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphenyl-pipérazine ; triazine-dione).

[¹¹C]MMP :

Le [¹¹C]MMP est l'analogue 2-méthoxyphényl du [¹¹C]MPT. Il est actuellement plus connu sous le nom de [¹¹C]CUMI-101 (Kumar et al., 2007). Ce composé présente une haute affinité pour les 5-HT_{1A} (avec un K_i de 1,36nM), une bonne sélectivité mais aussi un bon rendement de synthèse. Il semble donc être plus intéressant que ses analogues MPT ou MMT. Le radiomarquage est rapide (30min) et l'activité spécifique obtenue est de 9,62TBq/mmol (Kumar et al., 2007). Les études *in vivo* réalisées chez le babouin montrent un marquage des régions riches en récepteurs 5-HT_{1A}. Des métabolites radioactifs sont produits mais ne restent qu'au niveau périphérique. Ainsi, son affinité, sa sélectivité, sa fraction libre mesurable et son passage de la BHE en font un radiotraceur potentiel pour les récepteurs 5-HT_{1A} à haute affinité chez l'homme (Milak et al., 2008). Une étude récente montre que la fixation du [¹¹C]CUMI-101 est sensible à une augmentation de sérotonine extrasynaptique provoquée par l'injection de fenfluramine (Milak et al., 2010).

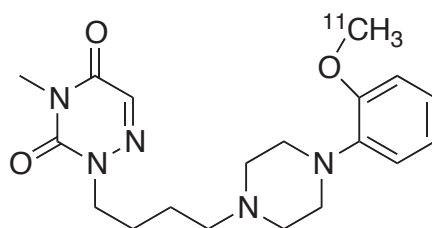


Figure 31 : Structure chimique du [¹¹C]MMP. (Groupements chimiques principaux : méthoxyphényl-pipérazine ; triazine-dione).

S14506 :

Le S14506 ou le (1-[2-(4-fluorobenzoylamino)ethyl]-4-(7-methoxynaphthyl)piperazine) est un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} avec une affinité (K_d : 0,79nM) similaire à celle de l'antagoniste WAY100635. Le WAY100635 marqué au carbone 11 étant un des radiotraceurs utilisés régulièrement en protocole de recherche clinique, l'équipe de Pike a décidé de marquer le S14506 à la fois au carbone 11 et au fluor 18. La synthèse est réalisée avec une pureté radiochimique supérieure à 97%. L'activité spécifique est comprise entre 1,3 et 3Ci/μmol pour la molécule marquée au carbone 11 et entre 1063 et 2302Ci/mmol pour la molécule marquée au Fluor 18 (Lu et al., 2010). Les expériences *in vivo* réalisées chez le rat

et le singe rhésus montrent une bonne pénétration de la barrière hémato encéphalique avec peu de métabolites non spécifique (Lu et al., 2010). Cependant, des compétitions avec la ciclosporine, un inhibiteur de la Pgp, montrent que ces molécules sont toutes deux des substrats de la Pgp, à la fois chez le rat et le singe.

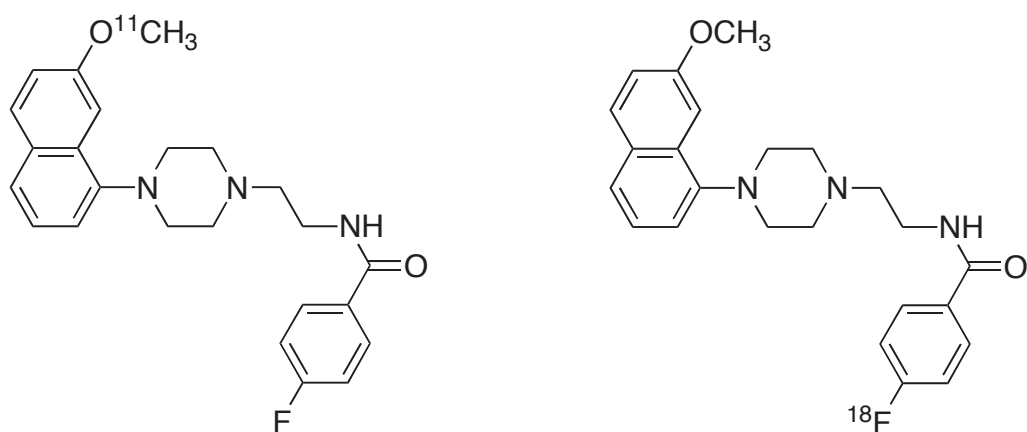


Figure 32 : Structure chimique du S14506. A gauche la molécule marquée au ¹¹C et à droite la molécule marquée au ¹⁸F. (Groupements chimiques principaux : méthoxynaphtyl-pipérazine ; 4-fluorobenzamide).

VI) L'imagerie TEP des récepteurs 5-HT₇

À l'heure actuelle pour l'imagerie TEP des récepteurs 5-HT₇, seule une molécule marquée au Carbone 11, a été décrite, le [¹¹C]DR4446 (1-méthyl-2a-[4-(4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-c]pyridin-5-yl) butyl]-2a,3,4,5-tetrahydro-1H-benz[cd]indole-2-one). Elle a été synthétisée en 2002 par une équipe japonaise de Chiba ([Zhang et al., 2002](#)). À l'issue de la synthèse radiochimique, l'équipe a obtenu une pureté radiochimique de 98% avec une activité spécifique de 73-120GBq/μmol. La première étude réalisée chez le singe a montré une bonne pénétration de la barrière hémato-encéphalique et un « binding » localisé dans les structures riches en récepteurs 5-HT₇. De plus, ce radiotracer produit peu de métabolites radioactifs. Mais, si il présente une bonne sélectivité pour le récepteur 5-HT₇ vis-à-vis des autres récepteurs 5-HT (avec un K_i pour les 5-HT_{1A} de 700nM et un K_i supérieur à 1000nM pour les autres récepteurs), il présente une affinité modérée pour les 5-HT₇ (K_i de 9.7nM), réduisant ainsi son usage comme radiotracer. En effet, les récepteurs 5-HT₇ ont une densité cérébrale assez faible, il faut donc optimiser l'affinité du radioligand pour ce récepteur. Ceci explique probablement qu'aucune publication n'a été faite depuis avec ce radiotracer.

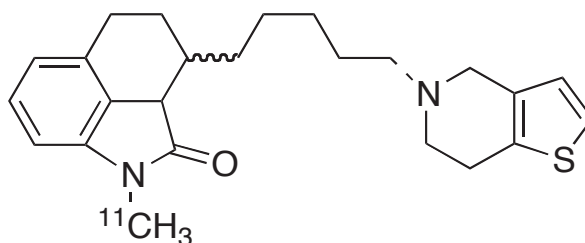


Figure 33 : Structure chimique du [¹¹C]DR4446. (Groupements chimiques principaux : tétrahydro-benzo-indolone ; tétrahydro-pyridine).

Les objectifs de la thèse

Le système sérotoninergique est impliqué dans un grand nombre de pathologies affectant le système nerveux central. Au cours de notre travail de recherche, nous nous sommes intéressés à deux récepteurs de la sérotonine (5-HT) pour lesquels il nous paraissait important de développer des outils moléculaires pour l'imagerie TEP.

Tout d'abord, les récepteurs 5-HT_{1A} (R-5HT_{1A}) ont attiré notre attention. Ce sont les récepteurs à la sérotonine les mieux décrits à l'heure actuelle et plusieurs traceurs existent déjà pour les étudier *in vivo*. Cependant, ces traceurs sont tous des antagonistes qui ne permettent pas d'observer spécifiquement les récepteurs fonctionnels. L'intérêt grandissant des agonistes des R5-HT_{1A} comme nouvelles molécules antidépresseurs, nous a décidé à développer un radiotracer TEP agoniste ouvrant de nouveaux champs dans l'imagerie moléculaire de ce système.

Le deuxième axe de cette thèse concerne les récepteurs 5-HT₇. À l'inverse des récepteurs 5-HT_{1A}, ils font partie des récepteurs ayant peu d'outils permettant la visualisation de ce récepteur. A l'heure actuelle, il n'existe encore aucun radiotracer TEP 5-HT₇. L'étude des récepteurs 5-HT₇ est d'un intérêt grandissant au vu des études précliniques le proposant comme piste thérapeutique. Cependant, il y a un véritable « goulot d'étranglement » entre la recherche expérimentale et la recherche clinique du fait de l'absence de passerelle en imagerie TEP.

Ce travail de thèse se scinde donc en deux parties. La première partie s'intéresse aux récepteurs 5-HT_{1A} avec l'exploration radiopharmacologique de deux molécules agonistes, le F15599 et le F13714 obtenues grâce à une collaboration avec les laboratoires Pierre Fabre (Castres). La deuxième partie concerne l'exploration d'une nouvelle série de molécules originales radiomarquées à visée 5-HT₇.

MATERIELS ET

METHODES

PARTIE I : PROTOCOLES LIES AUX RADIOTRACEURS 5-HT_{1A}

I) Radiomarquage du F15599, du F13714 et du MPPF

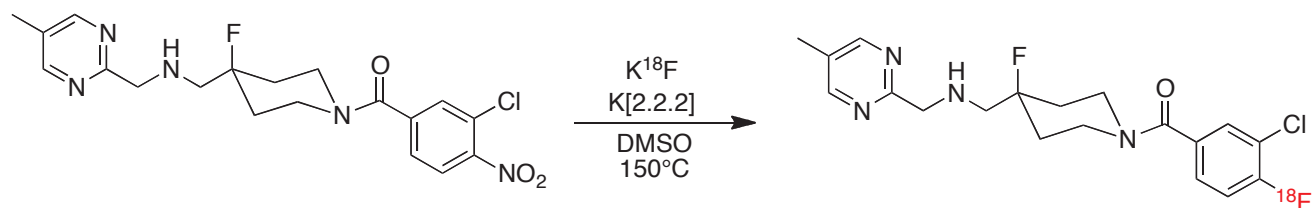
La production du fluor 18 est assurée par le cyclotron du CERMEP (modèle IBA Cyclone 18/9). La réaction nucléaire de type $^{18}\text{O} (p, n) ^{18}\text{F}$ est utilisée pour obtenir le fluor 18. En effet, c'est le résultat du bombardement d'eau enrichie en oxygène 18 par des protons de haute énergie cinétique. La radiosynthèse, consistant en une substitution nucléophile sur le précurseur, est réalisée par un automate de fluoration placé en cellule blindée.

Les opérations suivantes sont effectuées de manière automatisée en 90 min:

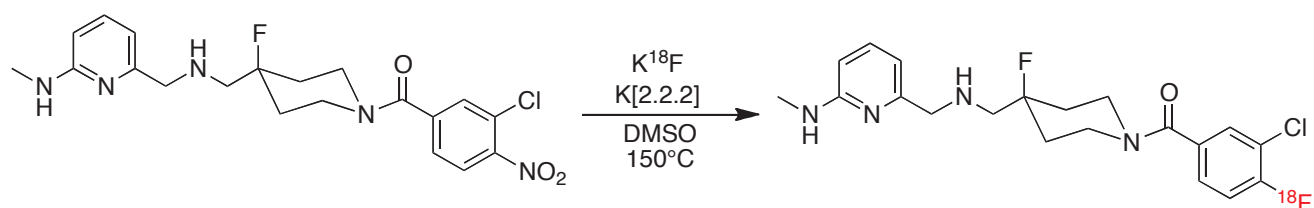
- 1) Collecte du fluor 18 provenant du cyclotron, séchage de ce radioélément pour le rendre anhydre ;
- 2) Marquage sur le précurseur nitré par substitution nucléophile avec des fluorures activés grâce au Kryptofix 2.2.2. pendant 10 min à 150°C (170°C pour le [^{18}F]MPPF) dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) ;
- 3) Pré-purification sur colonne ;
- 4) Séparation et recueil du produit par chromatographie liquide haute performance (HPLC) préparative;

Les [^{18}F]F15599 et [^{18}F]F13714 obtenus sont ensuite formulés pour leur administration injectable (mise en solvant NaCl 0,9%) et subissent un contrôle radiopharmaceutique (HPLC avec détection UV et radioactivité). La pureté radiochimique du [^{18}F]F15599 est supérieure à 95%, de même pour le [^{18}F]F13714. L'activité spécifique finale se situe entre 85 et 120 GBq/ μmol pour le [^{18}F]F15599 et 37 et 196 GBq/ μmol pour le [^{18}F]F13714. Le [^{18}F]MPPF est produit de la même manière de façon régulière au CERMEP lors d'examens TEP cliniques. Son activité spécifique est comprise entre 37 et 111GBq/ μmol et sa pureté radiochimique est de 99%.

[¹⁸F]F15599 :



[¹⁸F]F13714 :



[¹⁸F]MPPF :

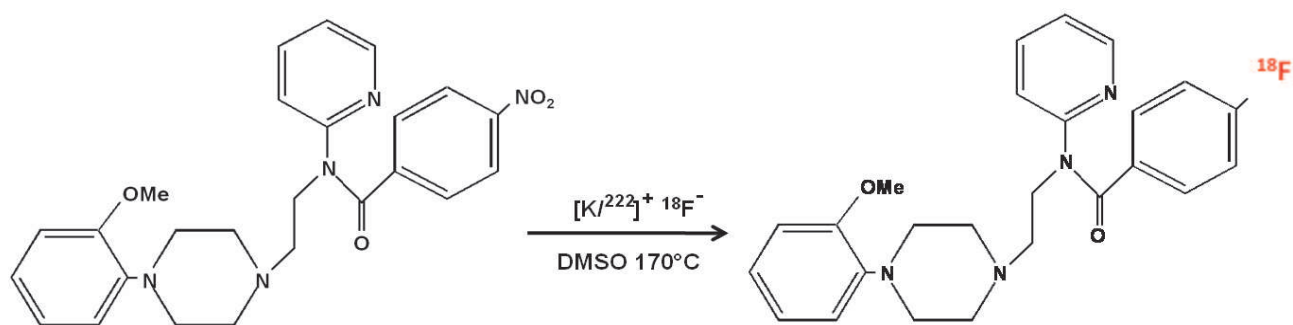


Figure 34 : Schémas des radiomarquages du [¹⁸F]F15599, du [¹⁸F]F13714 et du [¹⁸F]MPPF.

II) Les animaux et les procédures animales

1) Les animaux

a) Rats

Des rats mâles adultes, de souche Sprague Dawley (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) pesant 300-350g ont été utilisés dans toutes nos expériences. Ils sont hébergés dans des conditions standardisées de température (22°C), d'humidité (50%), avec cycle jour/nuit 12/12h et l'eau et la nourriture *ad libitum*.

b) Chats

Des chats mâles européens sont utilisés pour l'imagerie avec la caméra TEP. Ils proviennent de l'animalerie de l'INSERM U628 (Physiologie intégrée du système d'éveil, directeur : JS Lin) et de Charles River Laboratoires (l'Arbresle, France). Leur hébergement se fait dans une pièce commune de stabulation (24°C et 50% d'humidité) avec une lumière artificielle de 7h à 19h. Toutes ces procédures ont été réalisées selon les directives relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales (86/609/CEE) du 24 novembre 1986, et après accord du comité local d'éthique animale de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

2) Les procédures animales

a) Anesthésie

Rats

Les rats sont anesthésiés avec de l'uréthane (Sigma-Aldrich, France), injectés en intra-péritonéal (i.p.) à la dose de 1,25g/kg. L'uréthane permet une anesthésie longue (6h) et présente l'avantage de peu perturber les paramètres physiologiques cardio-vasculaires et respiratoires ([Shimokawa et al., 1998](#)). En revanche, il est hépato-toxique et doit être réservé à des anesthésies sans réveil c'est-à-dire avec euthanasie à l'issue de l'expérience. L'anesthésie provoquant une hypothermie, l'animal est placé sur un tapis chauffant (CMA/150 temperature controller, CMA/microdialysis AB, Suède) pour maintenir sa température à $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

Chats

Le mode d'anesthésie choisi pour les chats est l'anesthésie gazeuse. L'induction de l'anesthésie se fait dans une boîte d'induction hermétique avec insufflation d'un mélange d'air respirable (3 L/min) et d'isoflurane à 5% (Belamont ou Nicholas Piramal) pendant 5 min. Puis, l'anesthésie est maintenue avec un mélange d'air respirable à 2 L/min et 3% d'isoflurane. La quantité d'isoflurane peut augmenter jusqu'à 3,5%, selon l'animal utilisé et sa sensibilité. L'anesthésie volatile provoquant aussi une hypothermie, un système de tapis chauffant à circulation d'eau est utilisé pour maintenir la température corporelle du chat à $38 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Durant l'anesthésie, un monitoring de la saturation sanguine en oxygène (PO_2) et du rythme cardiaque est assuré par un oxymètre (Nonin 9847V, Nonin Medical Inc., Plymouth, USA).

b) Cathéterisation

Rats

Les rats sont cathétérisés dans la veine caudale pour permettre l'injection intraveineuse du radiotraceur ou des agents pharmacologiques. Le cathéter utilisé est radio-opaque, apyrogène et de petit diamètre (BD Insyte-W 24GA, Becton Dickinson Medical, France).

Chats

Pour les chats, le cathéter est inséré dans la veine surale. Après rasage de la patte, une perfusion de NaCl 0,9% à bas débit est mise en place pour éviter toute coagulation avant injection du radiotraceur. Le cathéter utilisé est un cathéter radio-opaque, apyrogène et de petit diamètre (BD Insyte-W 24GA, Becton Dickinson Medical, France).

III) Traitements pharmacologiques

a) WAY100635

Le WAY 100635, ((N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-ethyl]-N-(2-pyridinyl)-cyclohexacarboxamide-trihydrochloride, Sigma Aldrich, France), est un antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{1A}. Il est utilisé à une concentration de 1mg/kg dilué dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%).

b) 8-OHDPAT

Le 8-OHDPAT (8-hydroxy-2-(di-N-propylamino) tetraline, Tocris, Grande Bretagne) est un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} ayant également une composante 5-HT₇.

c) Ciclosporine

La ciclosporine ([R-[[R*,R*-(E)]]-cyclic(L-alanyl-D-alanyl-N-méthyl-L-leucyl-N-méthyl-L-leucyl-N-méthyl-L-valyl-3-hydroxy-N,4-diméthyl-L-2-amino-6-octenoyl-L- α -amino-butyryl-N-méthylglycyl-N-méthyl-L-leucyl-L-valyl-N-méthyl-L-leucyl ; Sandimmun, Novartis, France) est utilisée en clinique comme immunosuppresseur (après transplantation notamment). Dans notre contexte, elle est utilisée car elle bloque la glycoprotéine P (PgP), protéine située sur la barrière hématoencéphalique et qui peut limiter l'entrée de certains radiotraceurs ou d'autres molécules endogènes (Laćan et al., 2008). Dans nos protocoles, elle est utilisée à 50mg/kg en intraveineuse dans un mélange 50/50 de ciclosporine pure avec du sérum physiologique.

d) F15599

Le F15599 (3-chloro-4-fluorophenyl- [4-fluoro-4-[(5-méthylpyrimidin-2-yl)méthyl] amino] méthyl] piperidine-1-yl] methanone) est un agoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{1A} avec un Ki de 2,25nM qui agit plus particulièrement en postsynaptique (Newman-Tancredi et al., 2009). La molécule et son précurseur nitré sont synthétisés dans le laboratoire de chimie médicinale du Centre de Recherche Pierre Fabre à Castres.

e) F13714

Le F13714 (1-(3-Chloro-4-fluorobenzoyl)-4-fluoro-4-[5-méthyl-6-(méthylamino) pyridin-2-yl)méthylaminométhyl] piperidine fumarate) est un agoniste des

récepteurs 5-HT_{1A} présynaptique avec un Ki de 0,7nM (Vacher et al., 1999). La molécule et son précurseur nitré sont synthétisés dans le laboratoire de chimie médicinale du Centre de Recherche Pierre Fabre à Castres.

f) Gpp(NH)p

Le Gpp(NH)p (5'-guanylyl imido diphosphate, Sigma-Aldrich, France) est un analogue non hydrolysable du GTP (guanosyl tri phosphate) qui permet le découplage des récepteurs liés aux protéines G.

IV) Techniques utilisées

1) Autoradiographie *in vitro* chez le rat et le chat

a) Principe et instrumentation

L'autoradiographie est une technique permettant la détection à la fois qualitative et semi-quantitative de structures d'intérêt sur des coupes de cerveau. Cette détection se fait grâce à l'utilisation d'une molécule couplée à un isotope radioactif (un radiotraceur) se fixant spécifiquement sur la structure moléculaire d'intérêt (dans notre cas, les récepteurs sérotoninergiques).

L'appareil que nous possédons au CERMEP est le phospho-imageur (BAS 1800 II, Fujifilm). L'écran utilisé avec le phospho-imageur est composé d'une fine couche de cristaux photostimulables déposée sur un support en polyester, le tout recouvert d'une fine protection en plastique. Lorsque l'échantillon à analyser est mis au contact de l'écran, les particules chargées, ou les rayonnements électromagnétiques, peuvent déplacer les électrons de certains cristaux vers un état transitionnel durable. Ces électrons, piégés de manière prolongée entre les bandes de valence et les bandes de conduction, sont dans une situation de « transition interdite », créant ainsi une image des électrons excités. L'énergie ainsi stockée, va pouvoir être libérée par stimulation de l'écran avec un faisceau laser hélium-néon qui provoque une émission de lumière bleue. Cette luminescence est captée par un photomultiplicateur et l'image est constituée, point par point, par balayage de la plaque en quelques minutes. La finesse du faisceau laser, et son

pas de déplacement par rapport au plan des cristaux, conditionnent la résolution finale de l'image (50µm). La surface des plaques est de 20x25cm² et elles sont réutilisables (régénération par une source secondaire de lumière) ([Barthe N, 2007 pour revue](#)).

b) Préparation des lames pour l'autoradiographie

Rats

Après une induction « flash » de l'anesthésie à l'isoflurane, les rats sont euthanasiés par décapitation. Leur cerveau est ensuite délicatement et rapidement prélevé, rincé dans une solution de tampon TBS-HCL (pH 7,5) puis congelé dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane) refroidi à -29°C avec de la carboglace. Lorsque le cerveau est congelé, il est mis au congélateur à -80° pour être conservé en vue d'une utilisation future, s'il n'est pas utilisé directement. Des coupes de 30 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat à -20°C (Leica SM1850, Leica) au niveau de nos régions d'intérêts (cortex cingulaire, hippocampe, noyau du raphé dorsal et cervelet) repérées grâce à un atlas stéréotaxique de rat ([Paxinos and Watson, 1986](#)) puis fixées par adhérence sur des lames de verre sèches (Strar frost). Les lames ainsi préparées sont ensuite conservées à -80°C, au minimum pendant trois jours afin d'augmenter leur adhérence avant d'être utilisées pour les expériences d'autoradiographie.

Chats

Les chats sont euthanasiés par injection létale de pentobarbital en intrapéritonéal. Le cerveau est ensuite rincé avec une perfusion intracardiaque d'une solution de RINGER puis délicatement prélevé selon le protocole de Jouvét (Budat C et Sastres JP, communication personnelle). Les étapes suivantes pour la congélation, la préparation et la conservation des lames sont identiques à celles du rat.

c) Marquage des lames au [¹⁸F]F15599 et au [¹⁸F]F13714

Le jour de la synthèse du radiotraceur, les lames conservées à -80°C sont placées au contact de l'air ambiant durant 30 minutes pour sécher. Elles sont ensuite incubées à température ambiante pendant 20 min dans un tampon TBS-HCL (138mM

NaCl; 2,7mM KCl; pH ajusté à 7,6) contenant 37kBq (1 μ Ci/mL) de l'un des différents radiotraceurs, [18 F]F15599 ou [18 F]F13714 ou du [18 F]MPPF. Nous avons réalisé différentes compétitions afin de vérifier la spécificité de nos radiotraceurs. La fixation non spécifique a été vérifiée par l'ajout de sérotonine (5-HT) au bain d'incubation à différentes concentrations (1 μ M; 100nM; 10nM et 1nM) mais aussi avec l'ajout de WAY100635 (100nM; 10nM; 1nM) ou de 8-OHDPAT aux mêmes concentrations que le WAY100635. Des expériences de compétitions ont aussi été réalisées avec le ligand correspondant (F15599 ou F13714 à 1 μ M, 100nM, 10nM, 1nM ou 0,1nM). Enfin, nous avons également préparé des bains d'incubation avec ajout de Gpp(NH)p (1 μ M et 100nM) afin de vérifier si les radiotraceurs se fixaient à des récepteurs couplés aux protéines G.

Après les 20 min d'incubation, les lames sont rincées dans du tampon TBS-HCl (pH 7,6) à 4°C pendant 90 secondes puis dans de l'eau distillée à 4°C pendant 90 secondes avant d'être délicatement séchées. Une fois sèches, les lames sont disposées dans une cassette et l'écran du phosphor-imageur (BAS-1800 II, Fujifilm) est apposé contre ces lames pendant 60 min. La distribution de la radioactivité est visualisée grâce au phospho imageur (BAS 1800 II, Raytest, Germany) avec le logiciel d'analyse « Image Reader ». Les régions d'intérêts (cortex cingulaire, hippocampe et cervelet) sont repérées à l'aide d'un atlas stéréotaxique du cerveau du rat (Paxinos et Watson, 1986) et tracées manuellement avec le logiciel d'analyse « Multigauge » (Fujifilm, Raytest, Germany). Le bruit de fond radioactif est soustrait à toutes les valeurs semi-quantitatives obtenues. Les densités optiques obtenues, proportionnelles aux concentrations radioactives, sont exprimées en psl/mm² (« phospho stimulated luminescence » par unité de surface) et seront ensuite exprimées en pourcentage de témoin afin de normaliser les différentes expériences.

2) Autoradiographie *ex vivo* chez le rat

a) Définition

Nous utilisons le même phospho-imageur que pour l'autoradiographie *in vitro*. La différence avec l'autoradiographie *in vitro* est que les lames sont préparées après injection du radiotraceur à l'animal vivant.

b) Préparation de l'animal

Après une induction « flash » de l'anesthésie à l'isoflurane, les rats sont anesthésiés en intrapéritonéal avec de l'uréthane (1,25g/kg) de manière à leur poser un cathéter intraveineux sur la queue. Nous avons réalisé des expériences de compétitions *ex vivo* avec de la ciclosporine (50mg/kg) préinjectée en intraveineuse 30 min avant l'injection du radiotraceur ($[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ ou $[^{18}\text{F}]\text{F13714}$). Des compétitions sont également faites avec le F15599 ou le F13714 froid préinjecté en intrapéritonéal à 0,12 ; 0,25 ou 0,5mg/kg, 1h15 avant l'injection de 2mci de $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$.

c) Prélèvement du cerveau et préparation des lames

Vingt minutes après injection du radiotraceur, l'animal anesthésié est décapité. Le cerveau est prélevé, rincé dans une solution de Tampon TBS-HCL (pH 7,5) puis congelé dans une solution d'isopentane (2-méthylbutane) refroidi à -29°C avec de la carboglace. Des coupes de 30µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat à -20°C (Leica SM1850, Leica) au niveau de nos régions d'intérêt (cortex cingulaire, hippocampe, noyau du raphé dorsal et cervelet) puis fixées par adhérence sur des lames de verre sèches (Strar frost). Les lames ainsi préparées sont délicatement séchées et placées dans une cassette autoradiographique avec l'écran du phosphor imageur. Elles suivent ensuite les mêmes étapes que pour l'autoradiographie *in vitro* (apposition contre l'écran pendant 60 min, révélation puis analyse informatique).

3) Imagerie fonctionnelle microTEP et TEP

a) Déroulement des examens microTEP *ex vivo* chez le rat

Les examens microTEP *ex vivo* et *in vivo* ont été réalisés au CERMEP sur la caméra ClearTEP de Raytest (LYSO/LuYAP Phoswich scanner) utilisée en mode 3D (Sempere Roldan et al., 2006).

Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'uréthane (1,25 g/kg) puis un cathéter est inséré dans une veine latérale de la queue. Le WAY100635 (1mg/kg/i.v) est injecté 30 min avant, ou, dans une autre expérience, 15 min après l'injection du radiotraceur, le [^{18}F]F15599 ou le [^{18}F]F13714 (74MBq/2mCi/i.v). Dans les deux cas, le rat est décapité 30 min après l'injection du radiotraceur. Le cerveau est alors délicatement prélevé, rincé et placé sur le lit de la caméra microTEP au milieu de son champ de vision. La radioactivité est mesurée en une unique « frame » (fenêtre temporelle d'acquisition) de 45 min. Les images sont ensuite analysées avec le logiciel « Amide » (Medical Imaging Analysis Data Examen, free licence). Pour toutes les expériences, un rat témoin est réalisé avec préinjection ou une postinjection de NaCl (0,9%) en contrôle.

b) Déroulement des examens microTEP *in vivo* chez le rat

Les rats sont anesthésiés et cathétérisés comme décrit précédemment. Ils sont ensuite placés sur le lit de la caméra microTEP, avec la tête au milieu du champ de vue. Le radiotraceur est injecté en bolus de 15MBq (400 μCi) par la veine caudale. La durée totale d'acquisition est de 45 min, divisés en 20 « frames » séquentielles de durée croissante de 1 min à 5 min. À la fin de l'acquisition, l'image dynamique reconstruite est analysée avec le logiciel « Amide » (Médical Imaging Analysis Data Examen, free licence). Les régions d'intérêts (cortex cingulaire, hippocampe, noyaux du raphé et cervelet) sont tracées manuellement à l'aide de l'atlas stéréotaxique du cerveau de rat (Paxinos et Watson, 1986). Les valeurs de radioactivité obtenues sont exprimées en « SUV » (Standard Uptake Values) après normalisation.

c) Déroulement des examens TEP chez le chat

La caméra utilisée au Cermep est une caméra Ecat Exact HR+ (Siemens). Dans le mode 3D que nous utilisons, cette caméra a une résolution axiale de 3,5 mm et une résolution transaxiale de 4,5 mm. Le nombre de plans contigus réalisables est de 63 plans d'une épaisseur de 2,46 mm (Watabe et al., 2006).

Après anesthésie à l'isoflurane selon le protocole précédemment décrit, et cathétérisation, de la veine surale, le chat est placé en décubitus ventral sur le lit de la caméra TEP. Le chat est placé dans un cadre stéréotaxique en plexiglas et maintenu, latéralement grâce à des barres d'oreilles, et horizontalement grâce au masque d'anesthésie. Durant tout l'examen, un tapis chauffant à circulation d'eau (Hamilton, Industries, Ohio, USA) maintient sa température à $38 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Pour vérifier les constantes du chat (rythme cardiaque et saturation en oxygène), nous plaçons un oxymètre de pouls (Nonin 9847V, Nonin Medical Inc., Plymouth, USA) sur une oreille. Un scanner de transmission, visant à normaliser la contribution osseuse est réalisé durant 10 min avec des sources linéaires de germanium (^{68}Ge) et de gadolinium (^{68}Ga).

Le radiotraceur est injecté en bolus de 74MBq (2mCi) via la veine surale. L'activité spécifique pour le [^{18}F]F15599 se situe entre 85 et 120GBq et celle du [^{18}F]F13714 entre 37 et 196GBq. La durée d'acquisition est de 90 min, divisée en 31 « frames » séquentielles de durée croissante de 30 secondes à 10 minutes. Les images sont reconstruites et les régions d'intérêts (cortex cingulaire, hippocampe, noyaux du raphé et cervelet) sont tracées manuellement à l'aide du logiciel « Capp » (Clinical Application Programming Package) et à l'aide de deux atlas stéréotaxiques du cerveau de chat (Jasper and Ajmone-Marsan, 1954 ; Snider and Niemer, 1961). Les courbes de radioactivité régionales sont exprimées en Becquerel par unité volumique (Bq.cm^{-3}).

4) **Imagerie anatomique microIRM et IRM**

a) Déroulement des examens microIRM *in vivo* chez le rat

Une caméra 7 tesla (Bruker Biospec Magnet) couplée à un gradient Bruker BGA12 (450mT/m) est utilisée pour l'IRM anatomique. Une bobine de « Rapid biomedical »

est utilisée pour le signal d'émission et une antenne de surface de 2,5 cm de diamètre est utilisée pour englober la surface du cerveau de rat. Après anesthésie, le rat est placé dans l'aimant et des séquences d'acquisitions d'imagerie anatomique sont utilisées (séquences 3D d'échos gradient « Flash » ainsi qu'une séquence « 2D multislice », « multi écho-spin »). La résolution spatiale finale est de 117x117x500µm. Il est à noter que les images IRM acquises chez 5 rats ont été utilisées pour les recalages anatomiques de l'ensemble des rats utilisés pour les autres protocoles.

b) Déroulement de l'examen IRM chez le chat

Les chats sont anesthésiés à l'isoflurane et placés dans le cadre stéréotaxique en plexiglas dans les mêmes conditions que pour l'examen TEP. L'acquisition de l'IRM anatomique 3D dont les séquences ont été pondérées en T1 se fait sur une caméra 1,5T (Siemens Magnetom Scanner, Siemens AG) et dure 40 min. Une antenne proton de 63,6MHz est placée sur la tête de l'animal. Le volume anatomique couvrant le cerveau entier est avec des voxels de 0,7mm³. L'image anatomique obtenue a une résolution spatiale de 88x156 en 2D pour une épaisseur de coupe de 500 µm. Il est à noter que chaque chat utilisé en imagerie TEP a eu une IRM pour le recalage anatomique.

PARTIE II : PROTOCOLES LIES AUX RADIOTRACEURS 5-HT₇

Remarque : Dans la mesure où les protocoles liés aux radiotraceurs 5-HT₇ sont communs avec ceux des études 5-HT_{1A} (cf. précédemment), seules les spécificités des protocoles 5-HT₇ seront décrites.

I) Radiomarquage des précurseurs 5-HT₇ :

Les quatre précurseurs sont synthétisés au laboratoire et sont radiomarqués au CERMEP de la même manière que le F15599 et le F13714.

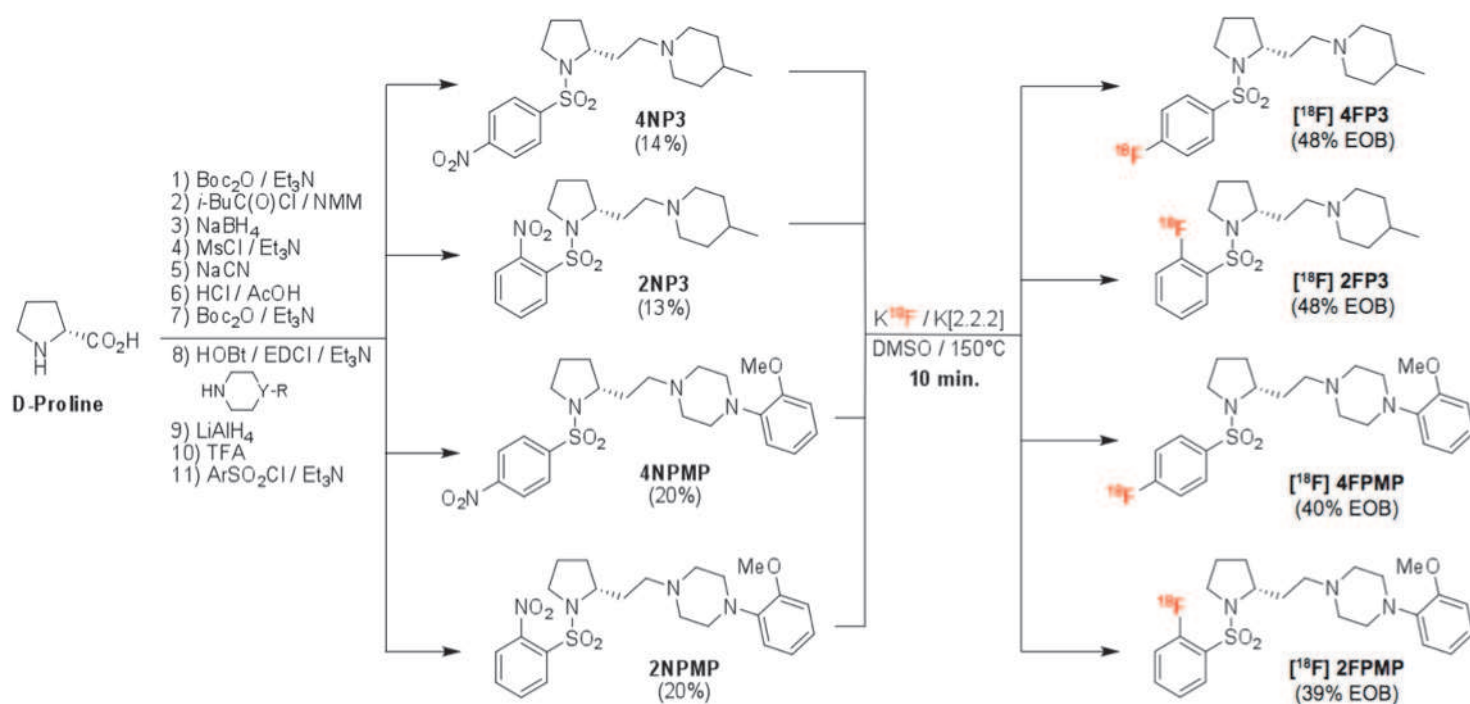


Figure 35 : Schéma de synthèse des précurseurs des quatre radioligands 5-HT₇ ainsi que leur radiomarquage au fluor 18.

Les précurseurs nitrés synthétisés sont radiomarqués au fluor 18 par substitution nucléophile aromatique. Le protocole de radiomarquage est très proche de celui décrit précédemment pour le [^{18}F]F15599 et le [^{18}F]F13714.

II) Les animaux et les procédures animales

Les expériences sont réalisées sur des rats mâles Sprague Dawley (300g) hébergés dans les mêmes conditions que précédemment. Les mêmes chats que dans la première partie ont été utilisés. Le calendrier des expériences a été organisé de manière à ce que chaque chat n'ai pas plus d'une anesthésie gazeuse par semaine (avec une répartition des expériences d'imagerie TEP sur un total de 5 chats).

III) Traitements pharmacologiques

Si nous avons réalisé des compétitions avec le WAY100635, le 8-OHDPAT et la ciclosporine tel que décrit précédemment, nous avons également fait des compétitions supplémentaires avec un antagoniste 5-HT₇, le SB269970 ou (2R)-1-[(3-Hydroxyphenyl) sulfonyl]-2-(2-(4-méthyl-1-piperidinyl) ethyl) pyrrolidine (Tocris Biosciences, Royaume Uni), et des ligands froids correspondant aux radiotraceurs.

IV) Techniques utilisées

1) Autoradiographie *in vitro* chez le rat

Nous avons réalisé différentes compétitions afin de vérifier la spécificité des radiotraceurs. La fixation non spécifique a été vérifiée avec l'ajout de sérotonine (5-HT à 1µM) au bain d'incubation mais aussi avec l'ajout de WAY100635 (1µM). Des expériences de compétitions ont également été réalisées avec le ligand froid correspondant au radiotracer étudié (4FP3, 2FP3, 4FPMP ou 2FPMP) à 1µM. Pour finir, nous avons réalisé des études de déplacement avec le SB269970 à différentes concentrations (1µM, 100nM, 10nM).

2) Imagerie microTEP et TEP

a) Déroulement des examens microTEP ex vivo chez le rat

L'anesthésie et la cathétérisation des rats ont été décrites précédemment. Le WAY100635 (1mg/kg/i.v) est injecté 30 min avant l'injection de l'un des quatre radiotraceurs des récepteurs 5-HT₇ à raison de 74MBq/2mCi/i.v. Le rat est décapité 30 min après l'injection du radiotraceur. Nous avons réalisé des expériences similaires avec préinjection, soit de la molécule froide correspondante (5mg/kg), soit de SB269970 (à 5mg/kg, 2mg/kg ou 1mg/kg). Pour toutes les expériences, un rat témoin est réalisé avec préinjection de NaCl (0,9%) en contrôle.

b) Déroulement des examens TEP chez le chat

Le protocole des examens est similaire à celui qui a été décrit précédemment pour les ligands 5-HT_{1A}. Dans le cadre de l'étude des récepteurs 5-HT₇, nous avons en plus réalisé des expériences de compétition en injectant, 30min avant l'injection du radiotraceur, du SB269970 (3mg/kg ; i.p et 1,5mg/kg ; i.v).

Les concentrations ont été choisies en fonction de ce que nous avons pu observer dans la littérature.

RESULTATS

EVALUATION RADIOPHARMACOLOGIQUE DE L'AGONISTE 5-HT_{1A} : LE [¹⁸F]F15599

I) Expériences de compétition avec le [¹⁸F]MPPF

1) Compétition *in vitro*

Le F15599 est un agoniste présentant une forte affinité *in vitro* pour les récepteurs 5-HT_{1A} (Kd : 2,24nM). Dans un premier temps, nous avons fait des expériences de compétitions avec le [¹⁸F]MPPF, antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A}. La compétition *in vitro* entre le [¹⁸F]MPPF et le F15599 froid à différentes concentrations permet de voir que dans le cortex cingulaire, la concentration nécessaire pour avoir un déplacement significatif du [¹⁸F]MPPF est de 1μM (Figure 36). À cette concentration, on obtient une diminution de 55%. Dans l'hippocampe, région riche en 5-HT_{1A}, nous observons une diminution de 50% du marquage à partir de 10nM de molécule F15599 froide. La dernière région étudiée, le noyau du raphé, montre une diminution de 80% du marquage radioactif à partir de 100nM de F15599 (Figure 36).

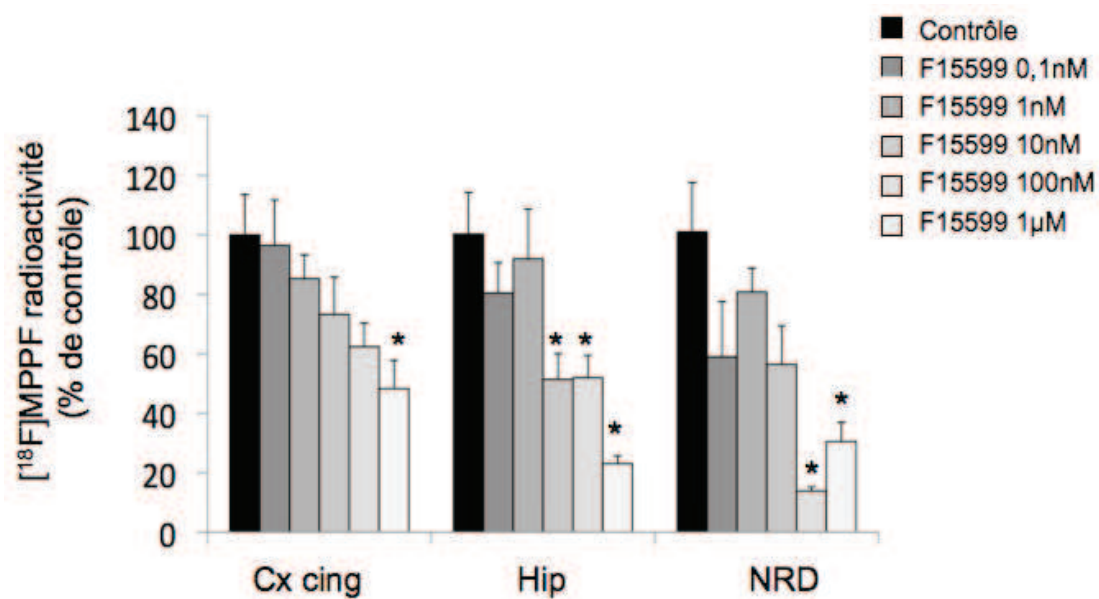


Figure 36 : Histogramme représentant la compétition in vitro chez le rat entre le $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ et le F15599 froid. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle et à différentes concentrations de ligand froid. Le contrôle correspond au marquage du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$. Cx cing : cortex cingulaire ; Hip : hippocampe ; NRD : noyau du raphé dorsal. (n= 3 rats ; * $p < 0,05$).

La Figure 37 permet de voir de manière qualitative les résultats obtenus avec les différentes compétitions *in vitro* entre le [^{18}F]MPPF et le F15599 froid.

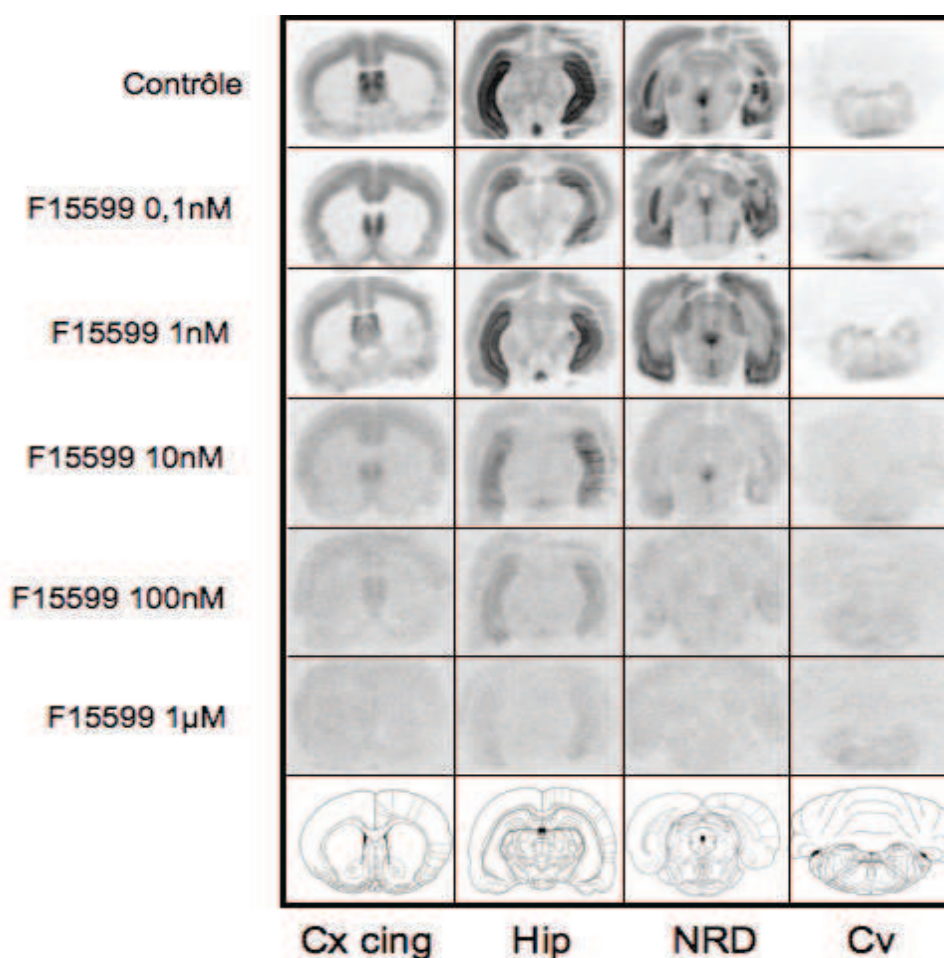


Figure 37 : Autoradiogrammes *in vitro* de coupes de cerveau de rat incubés avec le [^{18}F]MPPF et différentes concentrations de F15599 froid. Les régions observées de gauche à droite: cortex cingulaire (Cx cing), hippocampe (hip), noyau du raphé dorsal (NRD) et cervelet (Cv). La rangée du haut correspond au contrôle ([^{18}F]MPPF seul) et la dernière rangée correspond aux coupes correspondantes de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos et Watson, 1982).

2) Compétition *ex vivo*

Après les études *in vitro*, nous avons mis en place des études de compétition *ex vivo* chez le rat. Nous avons préinjecté différentes concentrations de F15599 en intra-péritonéal (75 min avant 2mCi de [^{18}F]MPPF). Les régions d'intérêts étudiées sont les régions riches en 5-HT_{1A}, c'est-à-dire le cortex cingulaire, l'hippocampe et le cervelet. Sur la Figure 38, nous pouvons observer une diminution de 60% du « binding » du [^{18}F]MPPF à la concentration de 0,5mg/kg pour les trois régions étudiées.

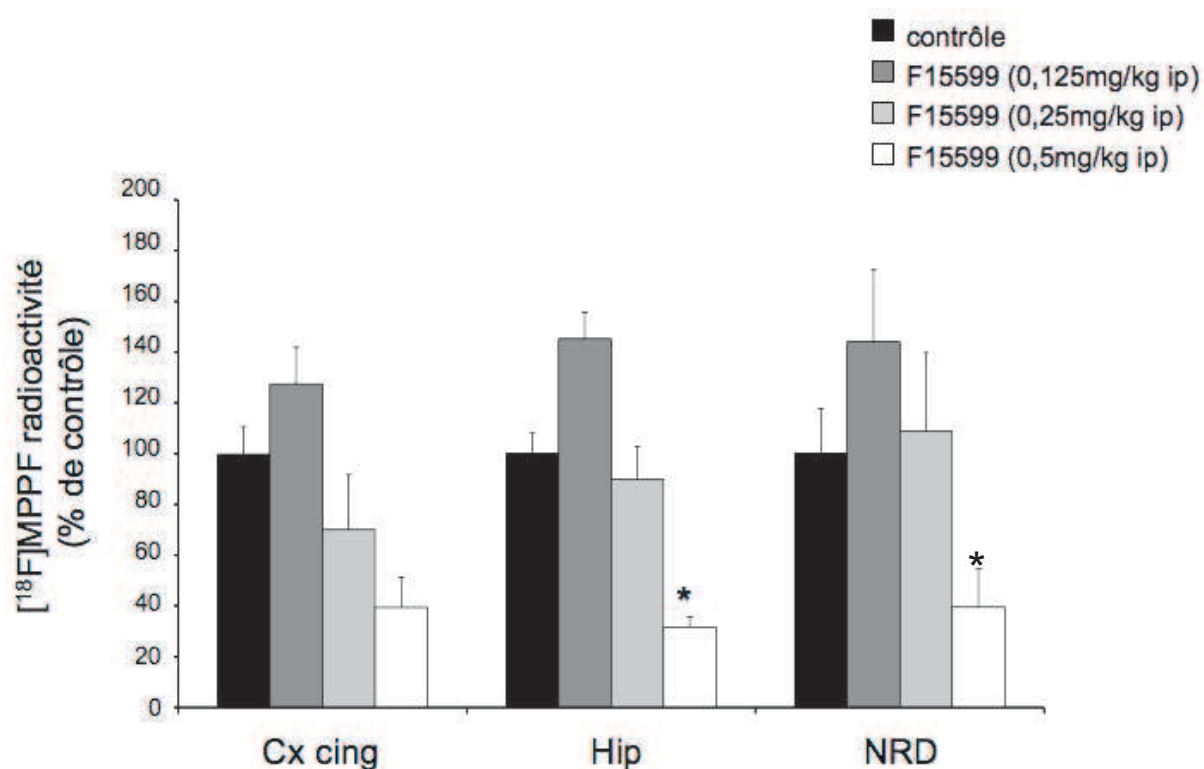


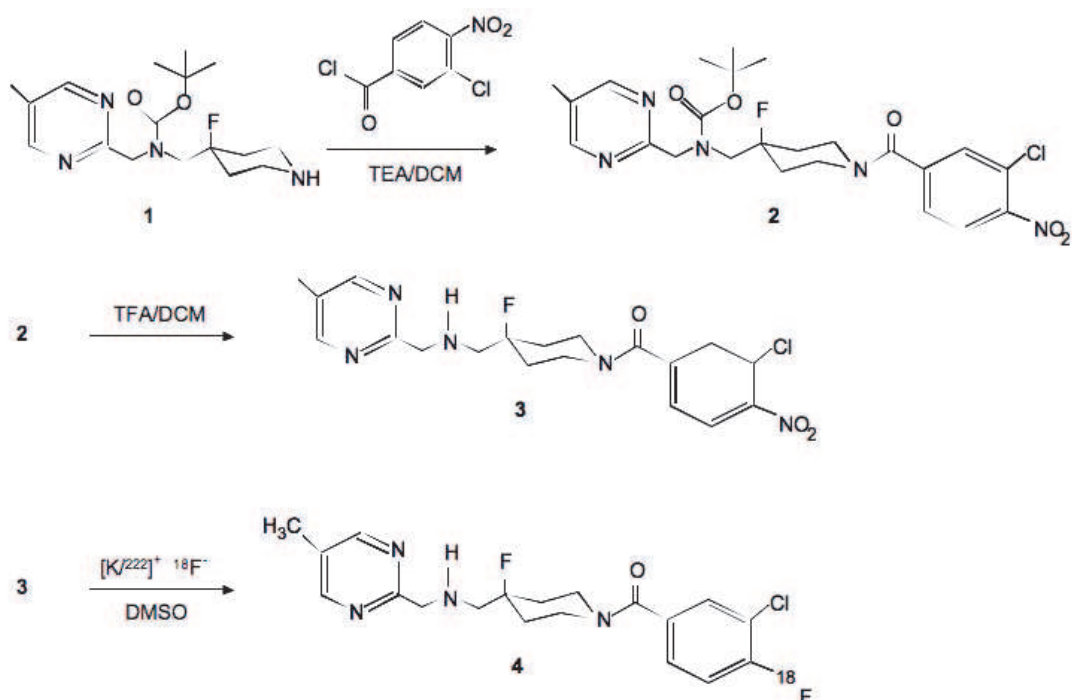
Figure 38 : Histogramme représentant la compétition *ex vivo* chez le rat entre différentes concentrations de F15599 et le [^{18}F]MPPF. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fixation par rapport au témoin de chaque région étudiée (Cx cing, Hip et NRD). (n=3-4 rats ; * p<0,05).

II) Radiomarquage du F15599 au fluor 18 et caractérisation radiopharmacologique

1) Réalisation du radiomarquage du F15599

La synthèse du F15599 et son radiomarquage au fluor 18 sont exposés dans la Figure 39. La synthèse du 3-Chloro-4-nitrophényl-(4-fluoro-4-[(5-méthylpyrimidin-2-ylméthyl) tertbutoxycarbonylamino] -méthyl}-piperidin-1-yl)-méthanone [2] est réalisé à partir de l'acide 3-chloro-4-nitrobenzoïque et de piperidine [1]. La suppression du groupe protecteur tertbutoxycarbonyl (BOC) produit le précurseur [3] avec une haute pureté. L'utilisation d'un module automatisé de fluoration reprogrammé permet le marquage du [^{18}F]F15599 à partir du précurseur nitré à 150°C, avec un rendement radiochimique de 30% corrigé de la décroissance pour un temps de radiosynthèse de 80 min. Aucun produit radioactif contaminant n'a été obtenu et les conditions de chromatographie liquide haute performance (HPLC) ont permis d'assurer une bonne séparation du [^{18}F]F15599 de son précurseur nitré, confirmé par le contrôle qualité (Figure 39B). La pureté radiochimique obtenue est supérieure à 98% et l'activité spécifique se situe entre 85 et 120GBq/ μmol à la fin de la synthèse. La lipophilie du composé a été déterminée dans un mélange octanol-eau et la valeur du log P est de 1,17 (moyenne de 3 expériences).

A



B

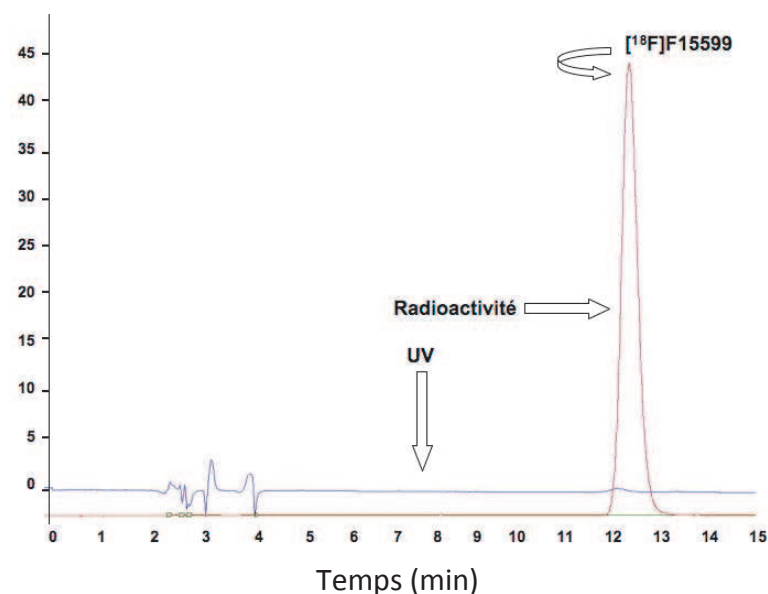


Figure 39 : A Schémas de synthèse du 3-Chloro-4-nitrophényl-(4-fluoro-4-[(5-méthylpyrimidin-2-ylméthyl) tertbutoxycarbonylamino] -méthyl}-piperidin-1-yl) -méthanone [2], du précurseur 3-Chloro-4-nitrophényl-(4-fluoro-4-[(5-méthylpyrimidin-2-ylméthyl) -amino] -méthyl}-piperidin-1-yl) -méthanone [3], et de la radiosynthèse du $[^{18}F]F15599$ [4]. B Chromatogramme final du $[^{18}F]F15599$. L'absorbance UV à 254 nm et la radioactivité montrent une pureté radiochimique supérieure à 99%.

2) Étude de la distribution *in vitro* du [^{18}F]F15599

Nous avons réalisé des expériences d'autoradiographie *in vitro* semi quantitative sur des coupes de cerveau de chat et de rat afin de déterminer les sites de liaison de notre nouveau radiotraceur. Des autoradiographies réalisées avec le [^{18}F]MPPF, radiotraceur spécifique des récepteurs 5-HT_{1A} ont été utilisées en contrôle (Figure 40). Les autoradiogrammes obtenus après incubation avec le [^{18}F]F15599 à concentration constante permettent d'observer des structures riches en récepteurs 5-HT_{1A} comme le noyau du raphé dorsal (NRD) (Figure 40 B ; D) ou encore l'hippocampe ventral et dorsal (Figure 40 A ; D) chez le rat ainsi que chez le chat. Les autoradiographies de contrôle réalisées avec une concentration constante de [^{18}F]MPPF permettent de voir la même liaison dans le noyau du raphé dorsal (Figure 40 B' ; D') et des hippocampes ventral et dorsal (Figure 40 A' ; D'). Les deux radiotraceurs ne montrent aucun marquage dans le cervelet qui est une région pauvre en récepteur 5-HT_{1A} (Figure 40 CC' ; EE'). Cependant, l'intensité de marquage du [^{18}F]F15599 est plus faible que celui du [^{18}F]MPPF (exprimé en unité arbitraire UA) dans l'hippocampe et dans le NRD. Ainsi, si l'on prend la fixation du [^{18}F]MPPF comme 100% de fixation au niveau des récepteurs 5-HT_{1A}, on peut voir un marquage pour le F15599 au niveau de l'hippocampe de l'ordre de 25% et de 45% chez le rat et le chat respectivement. Les mêmes calculs dans le NRD nous montrent une fixation de 25% et de 20% chez le rat et le chat respectivement. L'intensité de marquage est cependant la même pour le cortex frontal et cingulaire ainsi que pour le cervelet. (Ces expériences ont été réalisées en double chez le chat et en triple chez le rat).

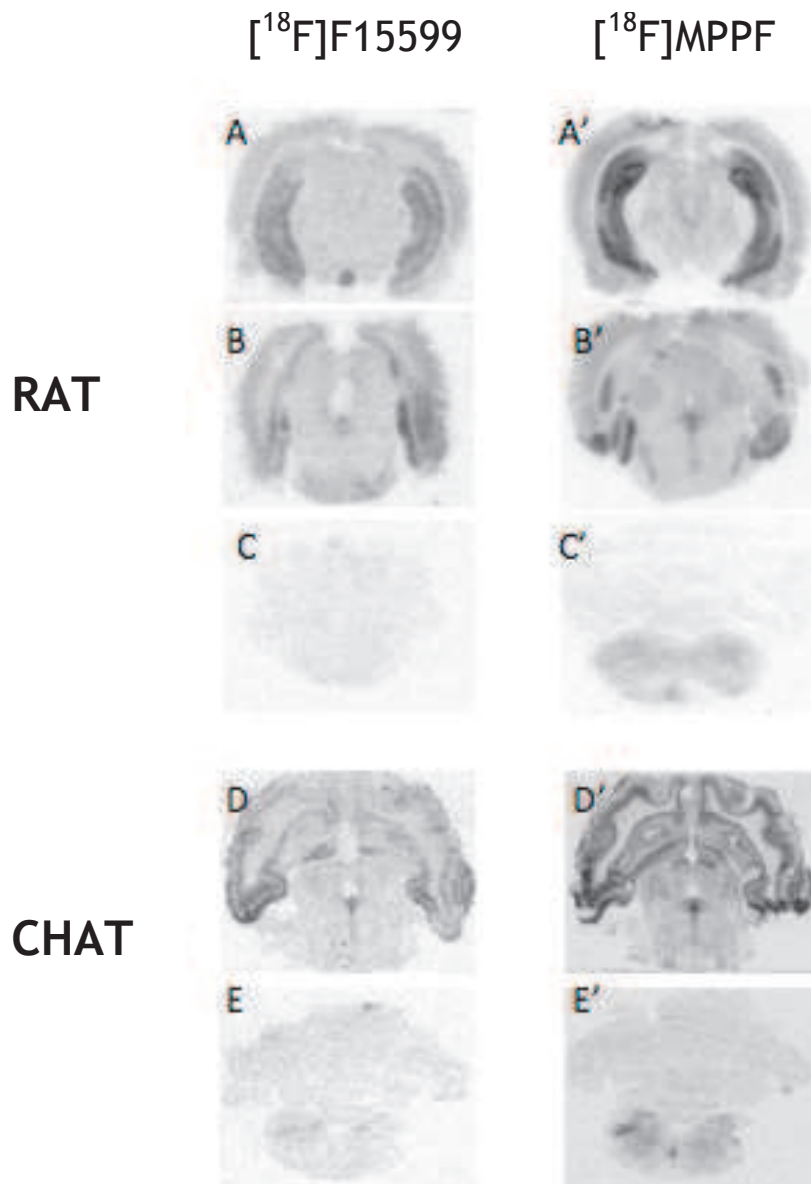


Figure 40 : Autoradiogrammes in vitro réalisés sur des coupes de cerveau de rat et de chat incubé avec des concentrations constantes de $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ en comparaison avec des coupes adjacentes incubées dans du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ (AA' hippocampe de rat ; BB' Noyau du raphé dorsal de rat ; CC' cervelet de rat ; DD' hippocampe et noyau du raphé dorsal de chat ; EE' : cervelet de chat).

3) Étude de compétition *in vitro* avec le [^{18}F]F15599

Dans le but de déterminer la sélectivité et la spécificité du [^{18}F]F15599 vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A}, nous avons réalisé différentes expériences de compétition *in vitro*. La première étape a été de vérifier la composante sérotoninergique de notre radiotracer en le mettant en compétition avec la sérotonine. L'ajout de sérotonine (5HT) à différentes concentrations (Figure 41) montre une diminution du marquage de 80% dans le cortex cingulaire avec une concentration de 1 μM . Dans l'hippocampe, la diminution est importante avec des concentrations plus faibles. En effet, on peut voir une diminution de 50% avec une concentration de 10nM de 5-HT.

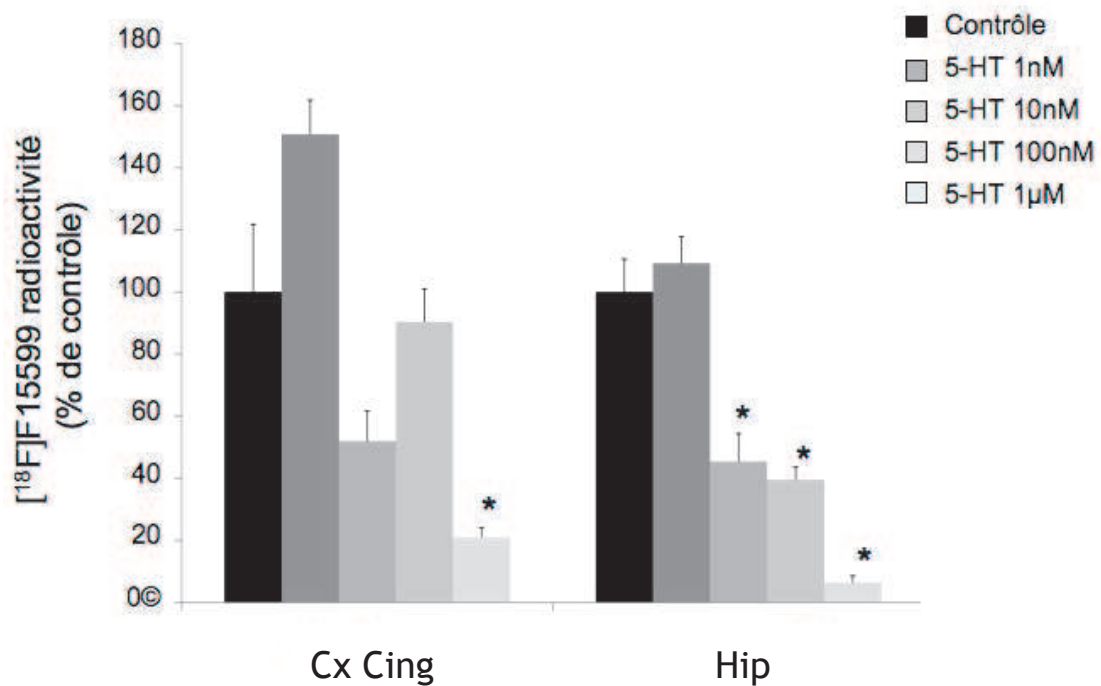


Figure 41 : Autoradiographie *in vitro* chez le rat montrant la compétition entre le [^{18}F]F15599 et la sérotonine. La radioactivité mesurée dans l'hippocampe est représentée à différentes concentrations de 5-HT et est exprimée en pourcentage de contrôle sans ajout de 5-HT (n= 3 rats ; * p<0,05).

Ensuite, nous avons étudié la composante 5-HT_{1A} du marquage du [¹⁸F]F15599. Nous avons tout d'abord réalisé des expériences de compétition avec le 8-OHDPAT, agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}. Les résultats (Figure 42) montrent un marquage nettement diminué dans l'hippocampe après ajout de différentes concentrations de 8-OHDPAT (-67% et -85 % avec des concentrations de 10nM et 100nM de 8-OHDPAT, respectivement). Les expériences réalisées dans les mêmes conditions avec le WAY100635, antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, montrent de la même manière une diminution du marquage de l'hippocampe (-69% et -76%) (Figure 42).

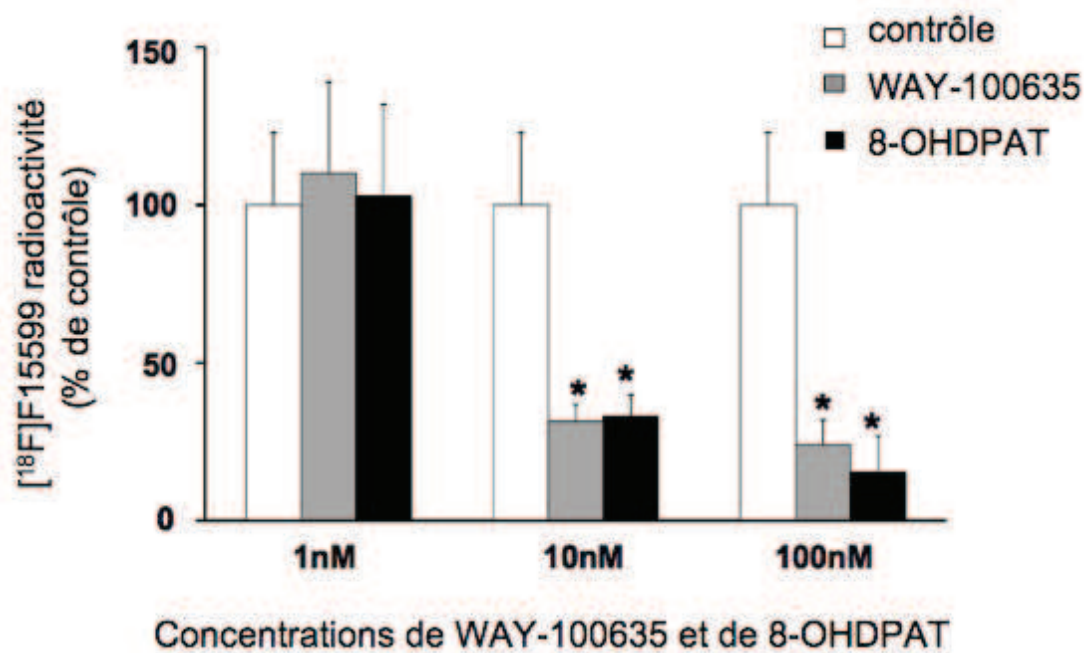


Figure 42 : Autoradiographie *in vitro* dans l'hippocampe de rat montrant la compétition entre le [¹⁸F]F15599 et deux ligands sélectifs des récepteurs 5-HT_{1A} : le WAY100635, antagoniste, et le 8-OHDPAT, agoniste. La radioactivité mesurée est représentée à différentes concentrations et est exprimée en pourcentage de contrôle. (n=3 rats ; * p<0,05).

Enfin, nous avons vérifié si le [^{18}F]F15599 avait gardé ses propriétés d'agoniste des récepteurs 5-HT $_{1A}$. Les agonistes ne se fixent que sur les récepteurs couplés aux protéines G c'est-à-dire les récepteurs fonctionnels. Nous avons donc réalisé des expériences de compétition avec le Gpp(NH)p. Le Gpp(NH)p est un analogue structural de GTP mais non hydrolysable. À une concentration de 10 μM , le Gpp(NH)p diminue le marquage du [^{18}F]F15599 de 70% dans l'hippocampe (Figure 43). Des expériences similaires réalisées avec le [^{18}F]MPPF, antagoniste, révèlent une augmentation du marquage de 30% dans la même région du cerveau certainement due à la libération de la sérotonine endogène (résultats non montrés).

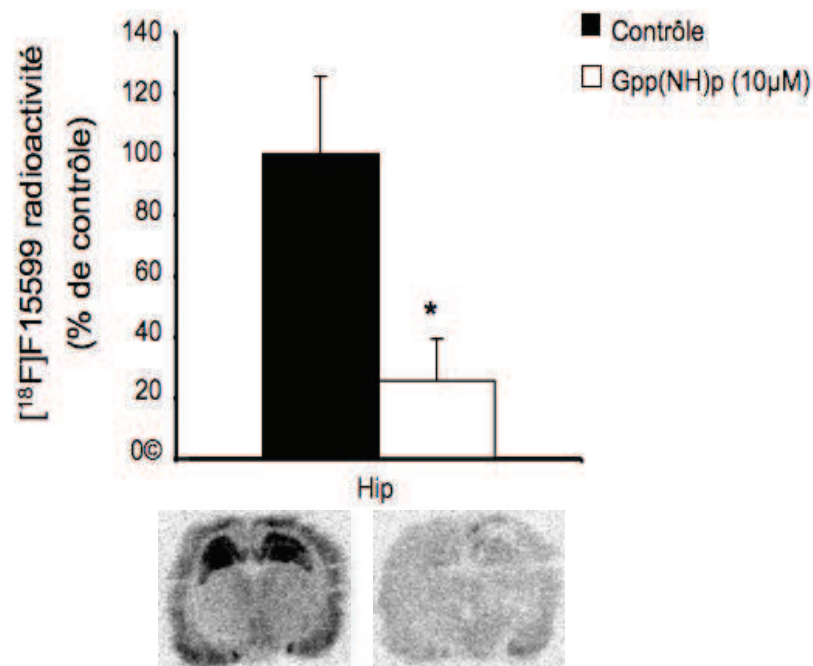


Figure 43 : Autoradiographie *in vitro* chez le rat montrant la compétition entre le [^{18}F]F15599 et le Gpp(NH)p à la concentration de 10 μM . La radioactivité mesurée est représentée à différentes concentrations et est exprimée en pourcentage de contrôle. Les images représentent les autoradiogrammes obtenus et la diminution du marquage de l'hippocampe avec ajout de Gpp(NH)p ($n=2$ rats ; * $p<0,05$).

4) Métabolites cérébraux chez le rat

Les études *in vitro* ne nous permettent pas d'avoir une idée du passage de la barrière hémato encéphalique ou encore de la métabolisation cérébrale du radiotraceur.

Tout d'abord, nous avons vérifié si le $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ est métabolisé dans le cerveau de rat. Les résultats montrent que la majeure partie de la radioactivité est due au $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$: 80% du $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ à 10 min après l'injection, 90% à 20 min après l'injection, 97% à 30 min après l'injection et 85% de $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ à 40 min après l'injection (Figure 44). Cette expérience a été réalisée en triple (avec quatre rats par expérience).

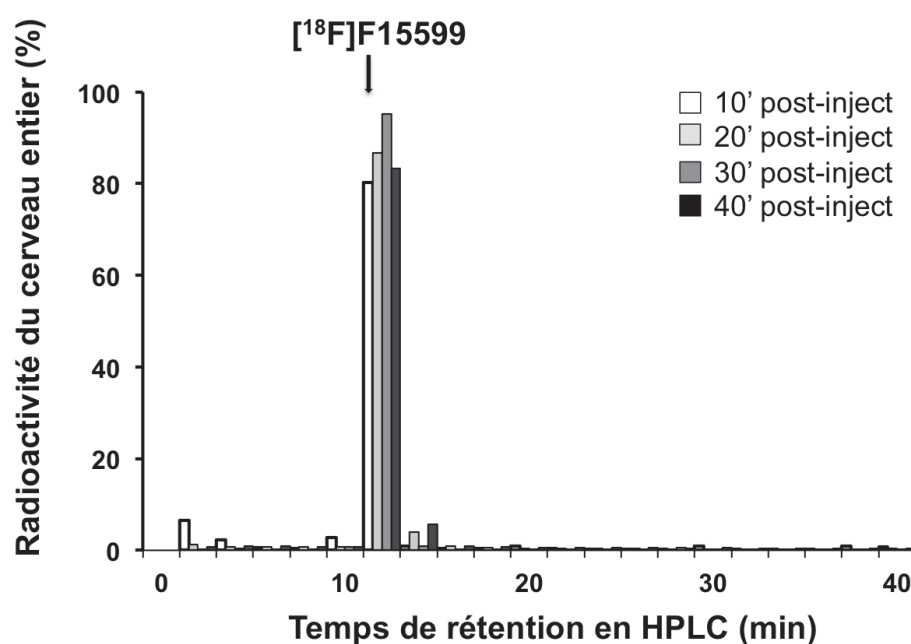


Figure 44 : Radiochromatogramme (séparation par HPLC et comptage radioactif par compteur γ) montrant le temps de rétention de $[^{18}\text{F}]\text{F15599}$ cérébral et son pourcentage par rapport à la radioactivité cérébrale totale.

5) Distribution *ex vivo* chez le rat

Les images de cerveaux isolés *ex vivo* de rat réalisées par microTEP, montrent un marquage des régions riches en récepteurs 5-HT_{1A} comme le cortex cingulaire. On peut aussi voir un marquage non spécifique dans les régions pauvres en 5-HT_{1A} comme le striatum ou encore dans la partie vasculaire du tronc cérébral vers le cervelet (Figure 45A). Le marquage observé au niveau du cortex est plus intense que pour les hippocampes bien qu'il s'agisse d'une région riche en récepteurs 5-HT_{1A} (cf images contrôles *ex vivo* avec le [¹⁸F]MPPF). La préinjection ou la postinjection de WAY100635, par rapport à l'injection du radiotraceur, diminue de manière significative le marquage cortical du [¹⁸F]F15599 (expériences faites en double, Figure 45B).

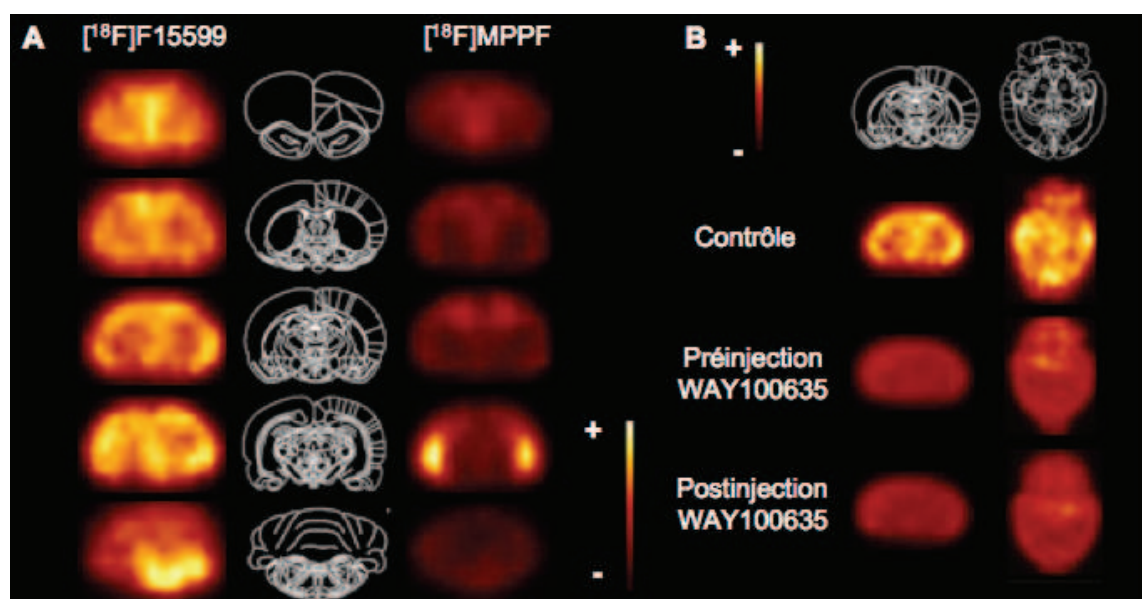


Figure 45 : A. Images du marquage *ex vivo* du [¹⁸F]F15599 ou du [¹⁸F]MPPF sur cerveau isolé en microTEP (acquisition de 45 min), 20 min après l'injection du radiotraceur (2mCi). La 1^{ère} colonne correspond aux images microTEP obtenues après injection du [¹⁸F]F15599 chez le rat (vue frontale). La 2^{ème} colonne présente les images anatomiques correspondantes. La 3^{ème} colonne correspond aux images microTEP obtenues après l'injection du [¹⁸F]MPPF chez le rat (vue frontale) (n=2 rats). B. Images *ex vivo* microTEP du [¹⁸F]F15599 sur cerveau de rat isolé (45 min d'acquisition), 20 minutes après l'injection du radiotraceur. La 1^{ère} rangée correspond aux coupes anatomiques frontales et transverses du cerveau de rat pour les images microTEP. La 2^{ème} rangée correspond aux images microTEP des coupes frontales et transverses du rat contrôle. La 3^{ème} rangée correspond aux images microTEP des coupes frontales et transverses du rat après préinjection de WAY100635, 30 min avant l'injection de [¹⁸F]F15599. Enfin la dernière rangée correspond aux images microTEP frontales et transverses du rat post injecté avec du WAY100635, 15 minutes après l'injection du [¹⁸F]F15599 (n=2 rats).

6) Étude de la distribution du [^{18}F]F15599 *in vivo* chez le rat et le chat

Les acquisitions *in vivo* en microTEP réalisées chez le rat entier montrent une rapide accumulation du [^{18}F]F15599, peu après son injection intraveineuse (Figure 46). L'acquisition réalisée pendant 45 min montre une forte accumulation dans l'hippocampe, du cortex cingulaire et du cervelet juste quelques minutes après l'injection chez le rat (Figure 46). Nous avons calculé des ratios de fixation à partir de la courbe de radioactivité en fonction du temps intégré entre 5 et 45min, et en prenant le cervelet en région contrôle car il est peu pourvu de 5-HT_{1A}. Le ratio de fixation, cortex cingulaire/cervelet est de 1,2 et pour l'hippocampe/cervelet, il est de 1,6. Ces expériences ont été réalisées en double.

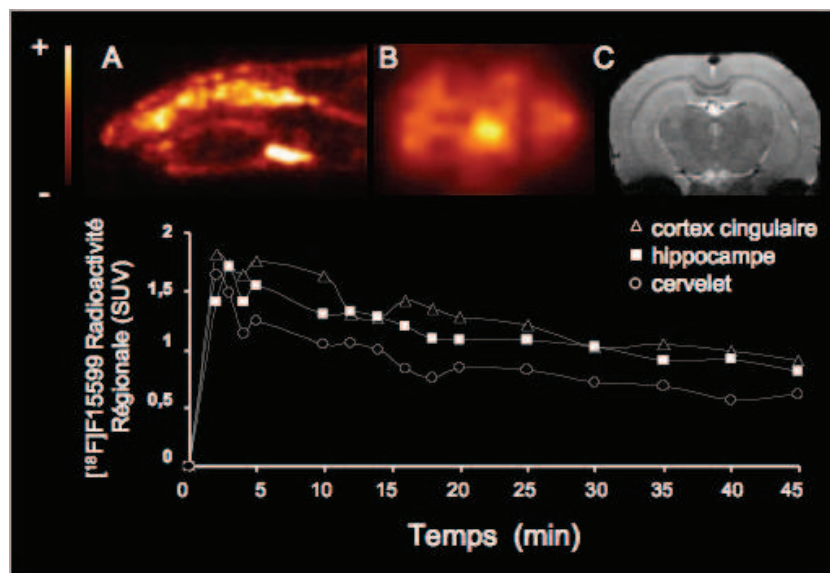


Figure 46 : Acquisition microTEP *in vivo* du [^{18}F]F15599 dans le cerveau de rat et la cinétique correspondante de radioactivité en fonction du temps (45 minutes d'acquisition). A : Image microTEP du rat en coupe sagittale. B : Image microTEP en coupe frontale de l'hippocampe. C : IRM correspondante en coupe frontale (n=2 rats).

De manière similaire à l'injection chez le rat, l'injection du [^{18}F]F15599 chez le chat en imagerie TEP montre elle aussi une rapide accumulation du radiotraceur dans le cerveau (Figure 47). Le maximum de radioactivité pénétrant dans le cerveau est atteint en moins de 5 min. Les ratios de fixation ont comme pour le rat été calculés en fonction du cervelet. Ainsi le ratio [cortex cingulaire/cervelet] est de 1,3 ; le ratio [cortex frontal/cervelet] est de 1,3 ; le ratio [cortex enthorinal/cervelet] est de 1,2 ; le ratio [amygdale/cervelet] est de 1,3 et enfin le ratio [noyaux du raphé dorsal/cervelet] est de 1,5 (Figure 47). On peut observer sur les images obtenues une forte fixation dans la région de l'éminence médiane (Figure 47C). Il est à noter que l'hippocampe, région riche en 5-HT $_{1A}$, ne présente pas de marquage important.

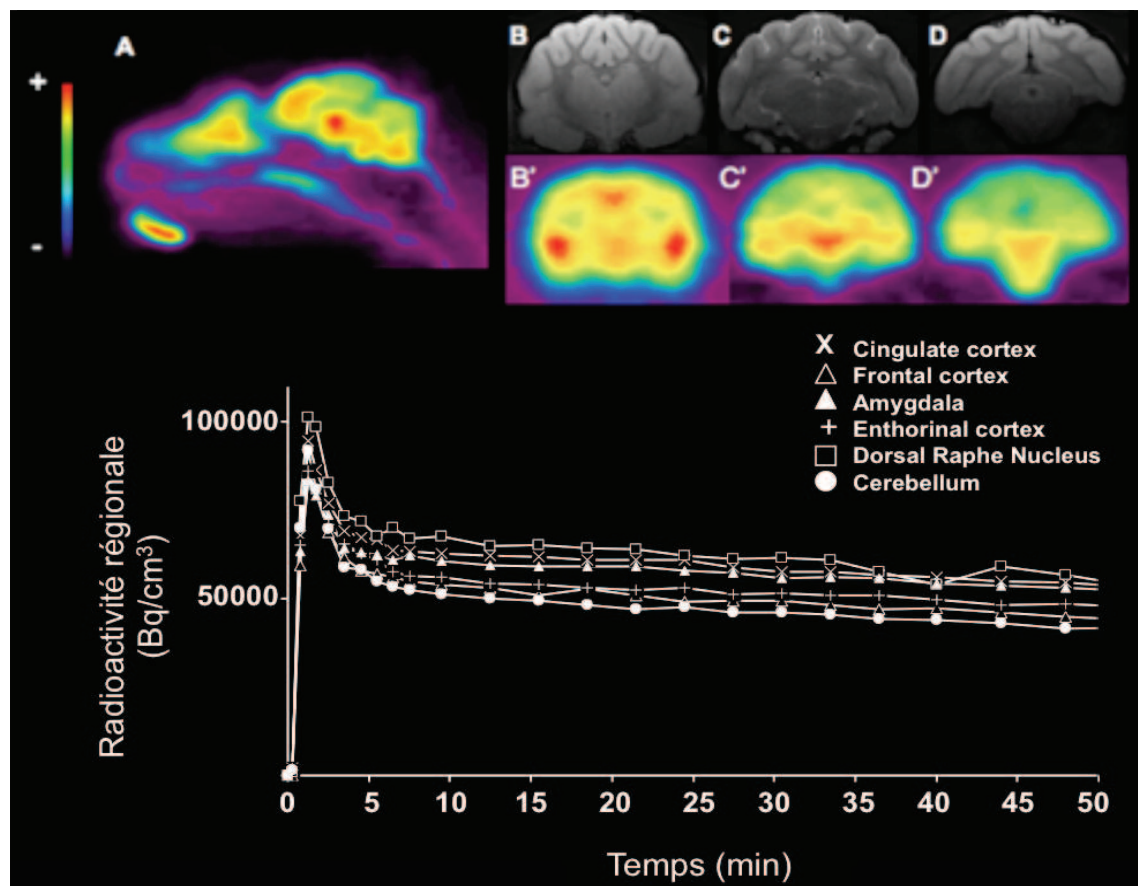


Figure 47: Acquisitions in vivo en TEP du [^{18}F]F15599 chez le chat et courbe de radioactivité en fonction du temps correspondante (acquisition de 45min). A: Coupe sagittale du cerveau de chat en imagerie TEP. BB' : IRM et image TEP correspondante en vue frontale (cortex cingulaire et enthorinal et de l'amygdale). CC' : IRM et image TEP correspondante en vue frontale (hippocampe). DD' : IRM et image TEP correspondante en vue frontale (noyau du raphé) (n=1 chat).

EVALUATION RADIOPHARMACOLOGIQUE DE L'AGONISTE 5-HT_{1A} : LE [¹⁸F]F13714

I) Expériences de compétition avec le [¹⁸F]MPPF

1) Vérification du caractère 5-HT_{1A} du F13714 par compétition *in vitro*

Le F13714, tout comme le F15599, est une molécule agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}. Son affinité pour les 5-HT_{1A} est de l'ordre de 0,01-0,05nM (Vacher et al.,1999 ; Newman-Tancredi et al, 2009). Nous avons réalisé des études de compétition *in vitro* avec le [¹⁸F]MPPF et le F13714 à différentes concentrations. Dans la région du cortex cingulaire, nous observons une diminution du marquage de 40% avec une concentration de F13714 à 0,1nM (Figure 48). La diminution est de 70% avec une concentration de 1nM. Au-dessus de 1nM, la diminution du marquage maximal obtenu est de 85% (Figure 48). Dans l'hippocampe, la diminution est significative à partir de 1nM de F13714 froid avec une diminution de 52%. Pour les concentrations supérieures à 1nM, on obtient une diminution de 95% (Figure 48). Enfin, dans la dernière région étudiée, le noyau du raphé dorsal, on obtient une diminution du marquage de 62% à la concentration de 0,1nM. Ensuite cette diminution est de 70% et 90% aux concentrations de 10nM à 1µM, respectivement (Figure 48).

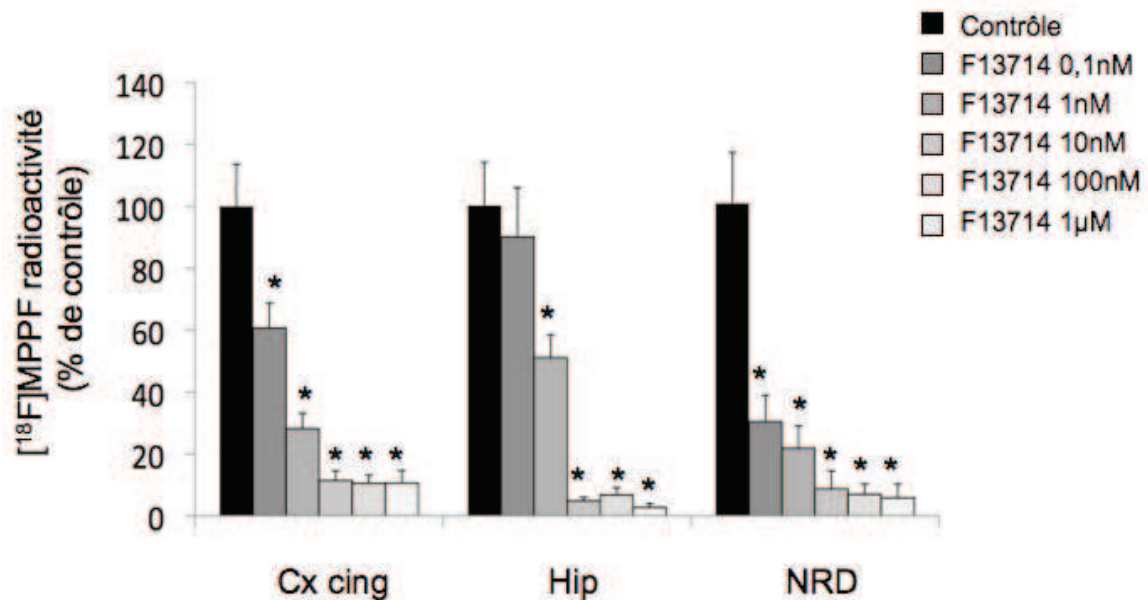


Figure 48 : Histogrammes représentant la compétition *in vitro* chez le rat entre le $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$ et le F15599 non radioactif. Différentes concentrations de F15599 froid ont été ajoutées au $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle (correspondant au marquage du $[^{18}\text{F}]\text{MPPF}$). Les différentes régions étudiées sont le cortex cingulaire (Cx cing), l'hippocampe (Hip) et le noyau du raphé dorsal (NRD) ($n= 3$ rats ; * $p<0,05$).

Ces résultats sont confirmés avec les autoradiogrammes (Figure 49). Il est à noter qu'aucun marquage n'est observé pour le cervelet (Figure 49).

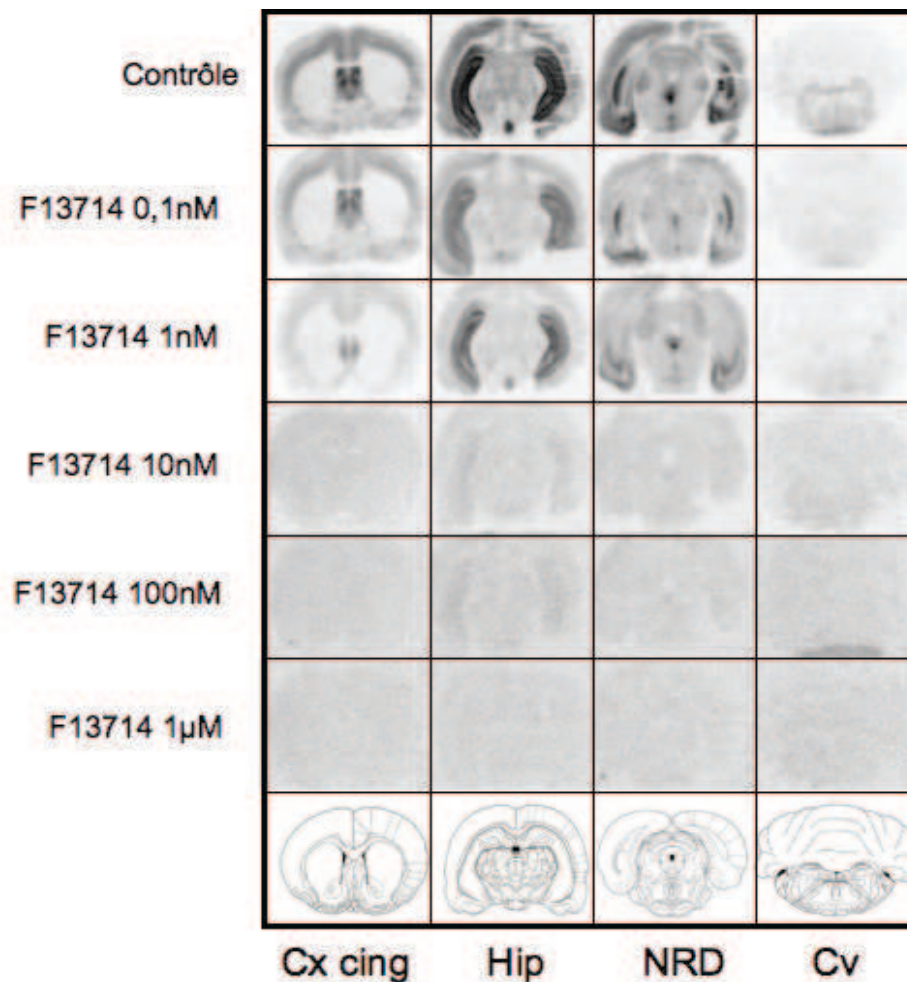


Figure 49 : Autoradiogrammes *in vitro* des coupes de cerveau de rat incubées avec le [^{18}F]MPPF et le F15599 froid. Le contrôle correspond au marquage du [^{18}F]MPPF seul. Cx cing : cortex cingulaire ; hip : hippocampe ; NRD : noyau du raphé dorsal ; Cv : cervelet. La dernière rangée correspond aux coupes correspondantes de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos et Watson, 1982).

2) Compétition *ex vivo*

La préinjection de F13714 froid, 75 min avant l'injection du [^{18}F]MPPF, entraîne une diminution du marquage radioactif dans toutes les structures étudiées (Figure 50). La préinjection de 0,125mg/kg de F13714 provoque un blocage du marquage au [^{18}F]MPPF de l'ordre de 80% pour le cortex cingulaire et de 50 % pour les autres structures étudiées (hippocampe et le noyau du raphé dorsal) (Figure 50). Les autres concentrations de F13714 provoquent une diminution du marquage similaire pour les trois structures étudiées. En effet, on observe une diminution de 70% et 90% pour les concentrations de 0,25mg/kg et 0,5mg/kg, respectivement (Figure 50).

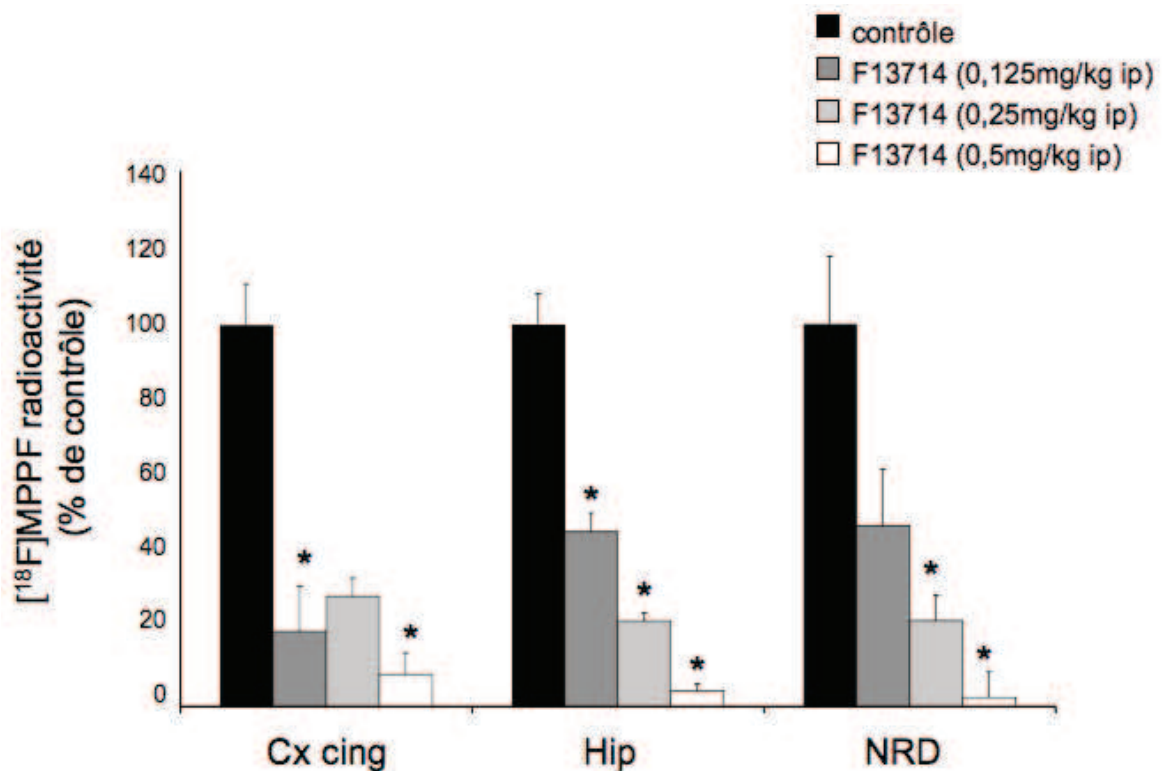


Figure 50 : Histogrammes représentant la compétition *ex vivo* entre le [^{18}F]MPPF et le F13714 froid. Le F13714 est injecté en intra-péritonéal à différentes concentrations (0,125mg/kg; 0,25mg/kg; 0,5mg/kg) 75 min avant le [^{18}F]MPPF. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fixation par rapport au témoin dans l'hippocampe. Cx cing : cortex cingulaire ; Hip : hippocampe ; NRD : noyau du raphé dorsal (n= 3-4 rats ; * p<0,05).

II) Radiomarquage du F13714 au fluor 18 et caractérisation radiopharmacologique

1) Réalisation du radiomarquage du F13714

La synthèse du F13714 et son radiomarquage au fluor 18 sont exposés dans la Figure 51. La synthèse du 3-Chloro-4-nitrophényl-(4-fluoro-4-[(5-méthyl-1-4-méthyl-tertbutoxycarbonylamino)-pyridin-2-ylméthyl)-tertbutoxycarbonylamino]-méthyl}-piperidin-1-yl)-méthanone [2] est réalisée à partir de l'acide 3-chloro-4-nitrobenzoïque et de piperidine [1]. La suppression des groupes protecteurs tertbutoxycarbonyl (BOC) produit le précurseur [3] avec une haute pureté. L'utilisation d'un module automatisé de fluoration reprogrammé permet le marquage du [^{18}F]F13714 à partir du précurseur nitré à 150°C, avec un rendement radiochimique de 10% corrigé de la décroissance pour un temps de radiosynthèse de 80 min. Aucun produit radioactif contaminant n'a été obtenu et les conditions de chromatographie liquide haute performance (HPLC) ont permis d'assurer une bonne séparation du [^{18}F]F13714 de son précurseur nitré, confirmé par le contrôle qualité (Figure 51). La pureté radiochimique obtenue est supérieure à 98% et l'activité spécifique se situe entre 50 et 140 GBq/ μmol à la fin de la synthèse. La lipophilie du composé a été déterminée dans un mélange octanol-eau et la valeur du log P est de 1,17 (moyenne de 3 expériences).

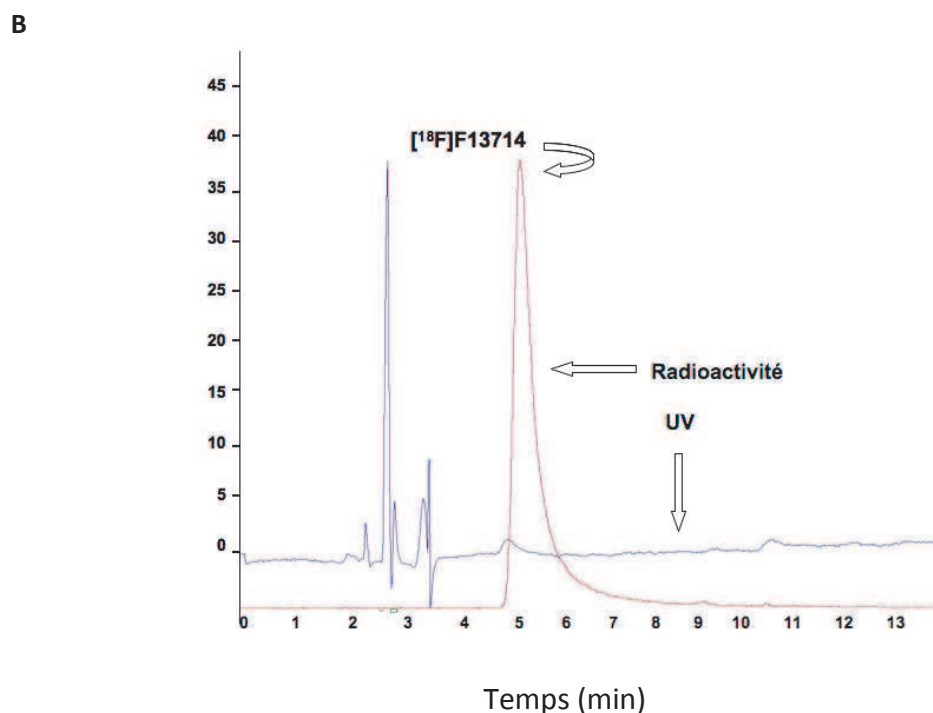
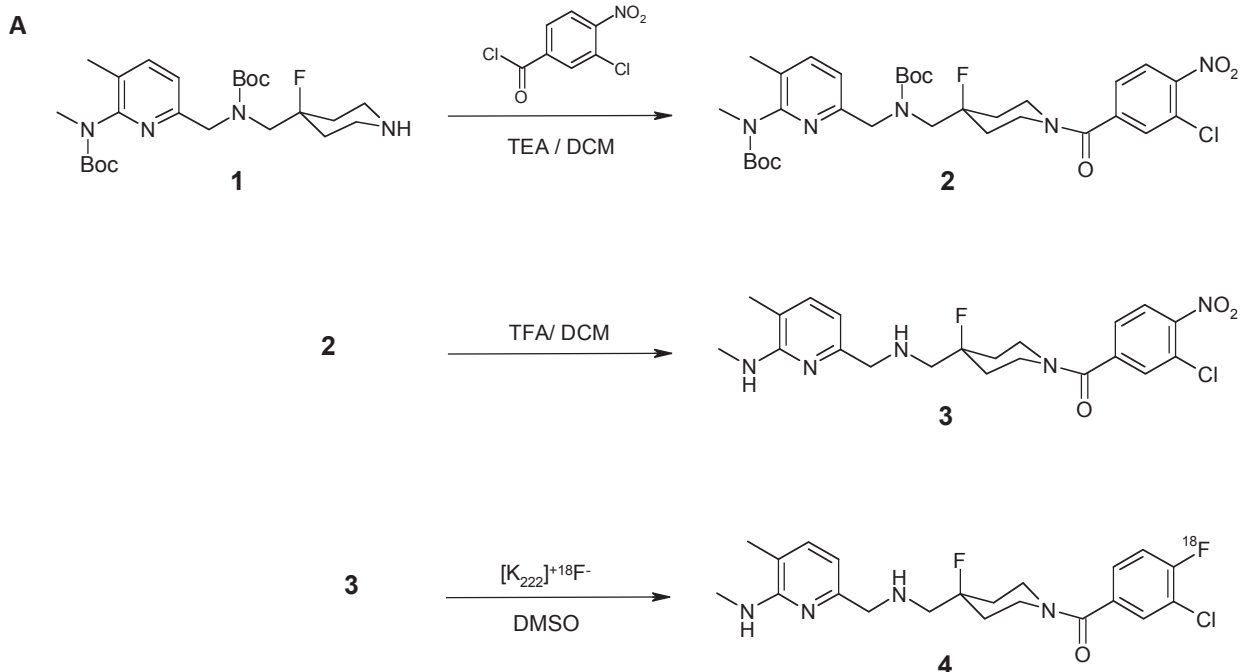


Figure 51 : **A** Schémas de synthèse du 3-Chloro-4-nitrophényl-(4-fluoro-4-[(5-méthyl-tertbutoxycarbonylamino)-pyridin-2-ylméthyl]-tertbutoxycarbonylamino)-méthyl-piperidin-1-yl)-méthanone [2], du précurseur 3-Chloro-4-nitrophényl-(4-fluoro-4-[(5-méthyl-4-méthyl)-amino]-pyridin-2-ylméthyl)-amino)-méthyl-piperidine-1-yl)-méthanone [3], et de la radiosynthèse du $[^{18}\text{F}]\text{F13714}$ [4]. **B** Chromatogramme final du $[^{18}\text{F}]\text{F13714}$. L'absorbance UV à 254nm et la radioactivité montrent une pureté radiochimique supérieure à 98%.

2) Étude de la distribution *in vitro* du [^{18}F]F13714

Des expériences d'autoradiographie *in vitro* semi quantitative sur des coupes de cerveau de chat et de rat ont été effectuées afin de déterminer la distribution du [^{18}F]F13714. Les autoradiogrammes obtenus après incubation avec le [^{18}F]F13714 à concentration constante permettent d'observer des structures comme l'hippocampe ventral et dorsal (Fig.52) et le noyau du raphé dorsal (Fig. 52) qui sont des structures riches en récepteurs 5-HT_{1A}, à la fois chez le rat et le chat. Il est à noter chez le rat une fixation plus forte de l'hippocampe avec le [^{18}F]F13714 par rapport au [^{18}F]MPPF avec un ratio [hippocampe/cervelet] de 5 pour le [^{18}F]F13714 et de 3,9 pour le [^{18}F]MPPF (résultats avec le [^{18}F]MPPF non montrés). Chez le chat, le [^{18}F]F13714 a un ratio de liaison [hippocampe/cervelet] de 4,6 et le ratio [cortex cingulaire/cervelet] est de 2,6.

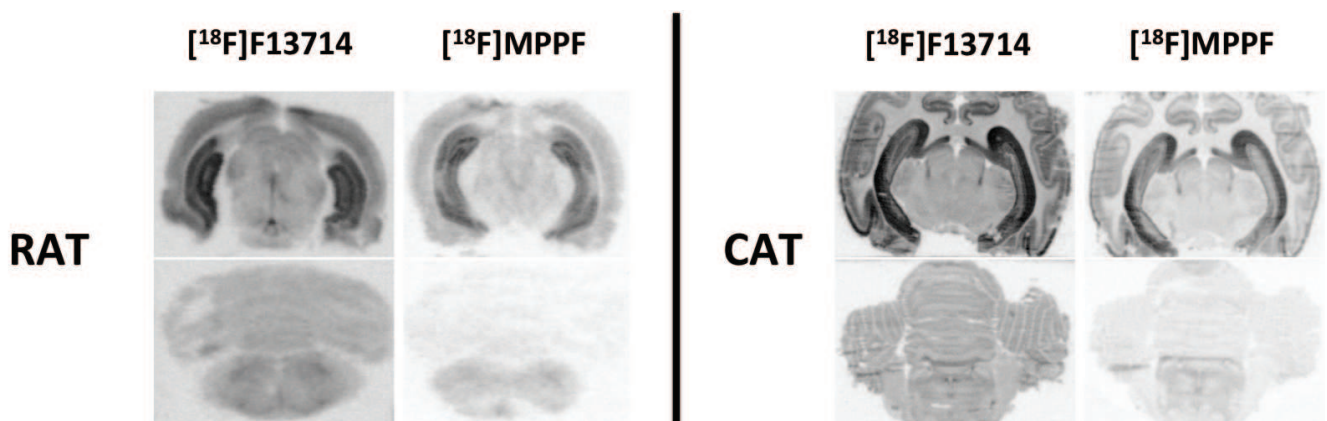


Figure 52 : Autoradiogrammes *in vitro* réalisés sur des coupes d'hippocampes et de cervelet de rat et de chat, incubées avec des concentrations constantes de [^{18}F]F13714 et de [^{18}F]MPPF.

3) Études *in vitro* du [^{18}F]F13714

La compétition *in vitro* avec la sérotonine montre une diminution du marquage de 70 % à la concentration de 100nM de 5-HT, à la fois dans le cortex cingulaire et l'hippocampe (Figure 53). La forte concentration de 1 μM de 5-HT entraîne une diminution de 85% et 95% du marquage du [^{18}F]F13714 dans le cortex cingulaire et l'hippocampe, respectivement (Figure 53).

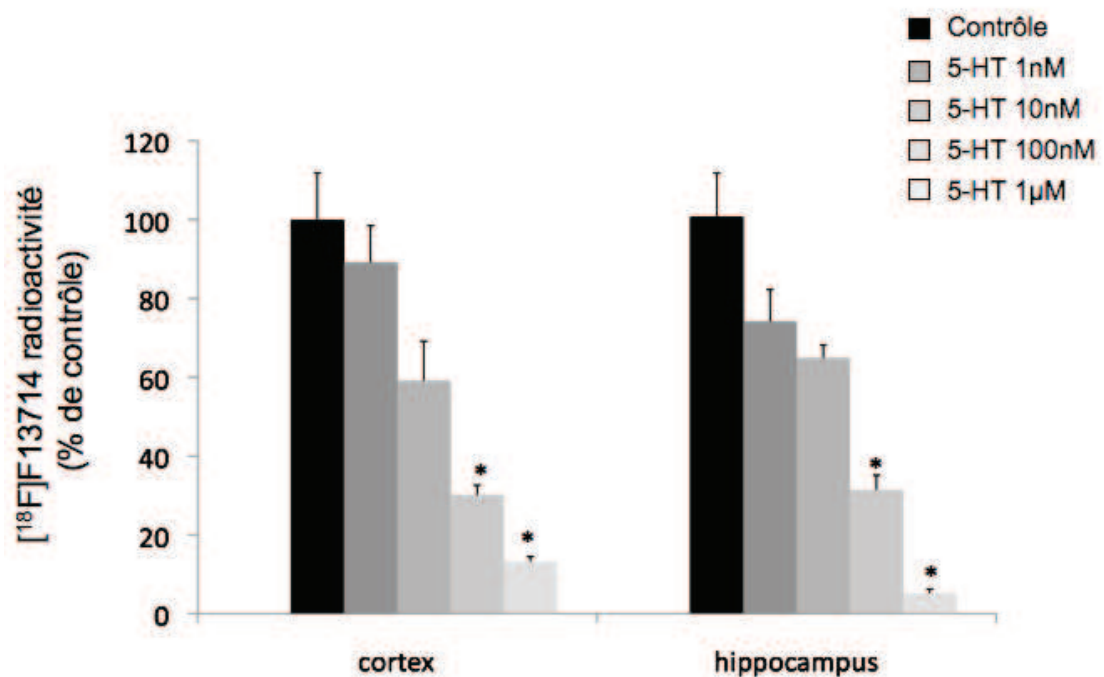


Figure 53 : Histogrammes de la compétition *in vitro* réalisée chez le rat entre le [^{18}F]F13714 et la sérotonine à différentes concentrations. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle (sans ajout de 5-HT). (n=3 rats ; * p<0,05).

Dans les expériences de compétition *in vitro* avec le F13714 froid et le [^{18}F]F13714, nous obtenons une diminution du marquage presque totale pour une concentration de 1 μM de 5-HT à la fois pour le cortex cingulaire et l'hippocampe (Figure 54). La compétition avec un antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT $_{1A}$, le WAY100635, montre une diminution du marquage du [^{18}F]F13714 de plus de 92% dans les deux régions étudiées (Figure 54).

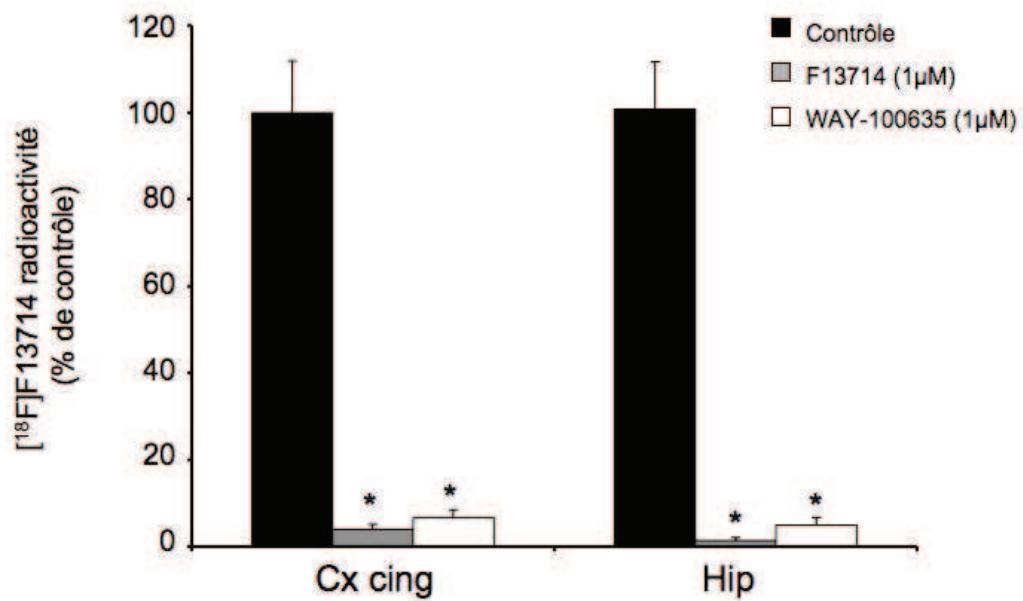


Figure 54 : Histogrammes de la compétition *in vitro* entre le [^{18}F]F13714 et le F13714 froid ou le WAY100635, à la concentration de 1 μM . Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle. (Cx cing : cortex cingulaire ; Hip : hippocampe) (n=3 rats ; * $p < 0,05$).

Enfin, la dernière étude *in vitro* a été réalisée avec le Gpp(NH)p à 10 μ M. Nous observons une diminution de 60% du marquage du [18 F]F13714 hippocampique (Figure 55).

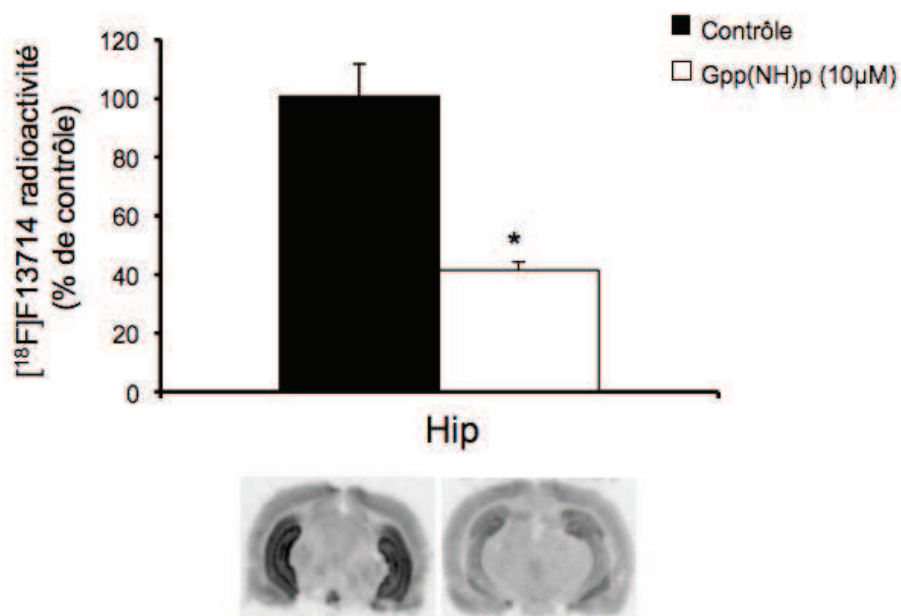


Figure 55 : Histogrammes représentant la diminution du [18 F]F13714 après ajout de Gpp(NH)p (10 μ M). Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle. Au bas, les autoradiogrammes de l'hippocampe avec ajout de Gpp(NH)p (n=2 rats ; *p<0,05).

4) Études de compétition *ex vivo*

La préinjection de ciclosporine (50mg/kg) avant injection de [^{18}F]F13714 entraîne une augmentation du marquage du [^{18}F]F13714 de plus de 50 %, à la fois au niveau du cortex cingulaire et de l'hippocampe (Figure 56). Les images *ex vivo* réalisées permettent de visualiser cette augmentation (Figure 56).

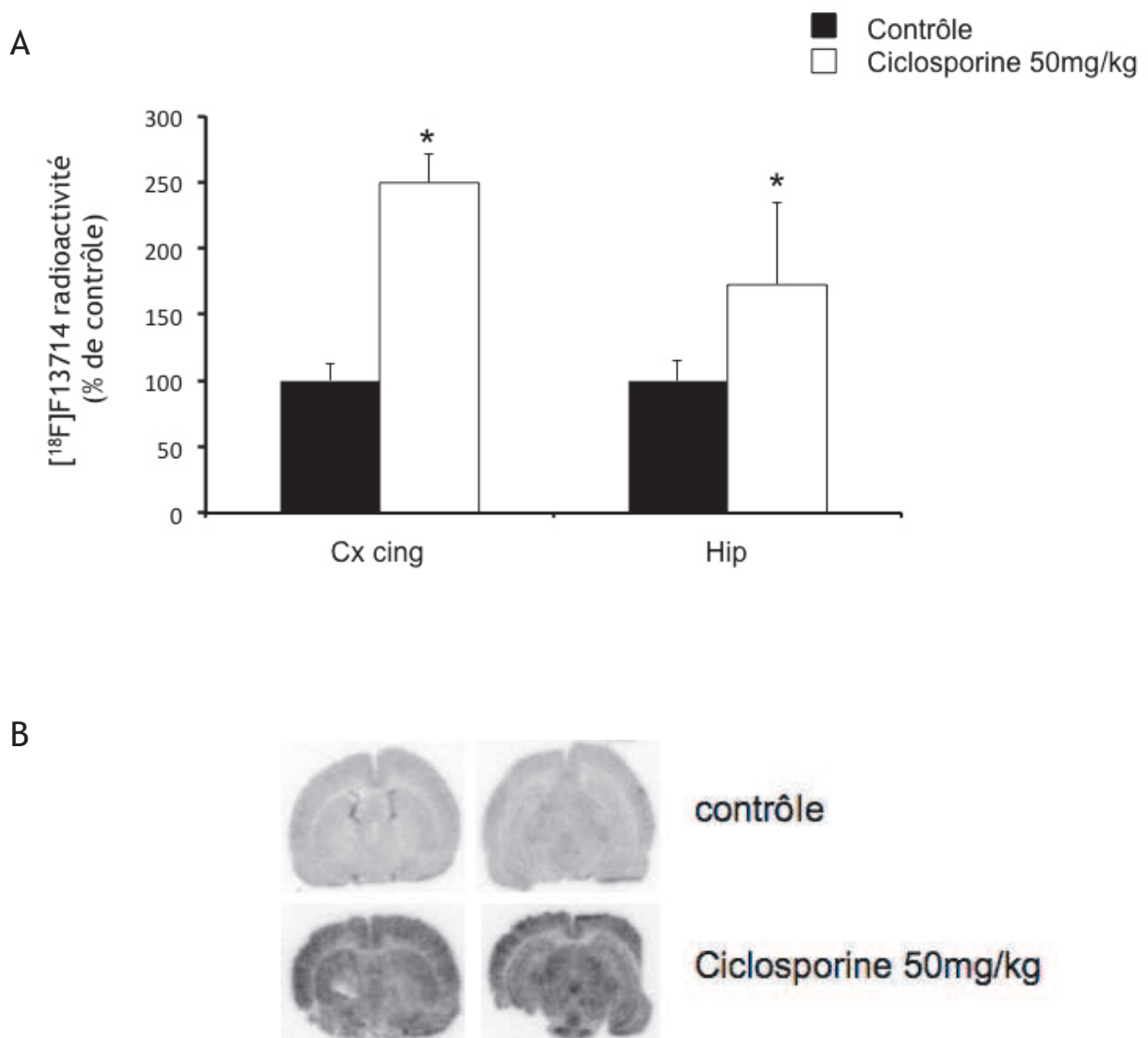


Figure 56 : **A** Histogrammes représentant l'augmentation de fixation cérébrale du [^{18}F]F13714 après une préinjection de ciclosporine à 50mg/kg, 30 min avant le radiotraceur. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle. Cx cing : cortex cingulaire ; hip : hippocampe. **B** Autoradiographies correspondantes. (Colonne de gauche : cortex cingulaire ; colonne de droite : hippocampe) (n=2 rats ; * $p < 0,05$).

5) Étude des métabolites radioactifs

Les études *in vitro* ne nous permettent pas d'avoir une idée du passage de la barrière hémato encéphalique ou encore de la métabolisation cérébrale du radiotraceur.

Tout d'abord, nous avons vérifié si le $[^{18}\text{F}]\text{F13714}$ est métabolisé dans le cerveau de rat. Cette expérience a été réalisée sur quatre rats. Les résultats montrent que la majeure partie de la radioactivité est due au $[^{18}\text{F}]\text{F13714}$: 60% du $[^{18}\text{F}]\text{F13714}$ à 10 min après l'injection, 90% à 20 min après l'injection, 95% à 30 min après l'injection et 90% de $[^{18}\text{F}]\text{F13714}$ à 40 min après l'injection (Figure 57). Cette expérience a été réalisée en triple.

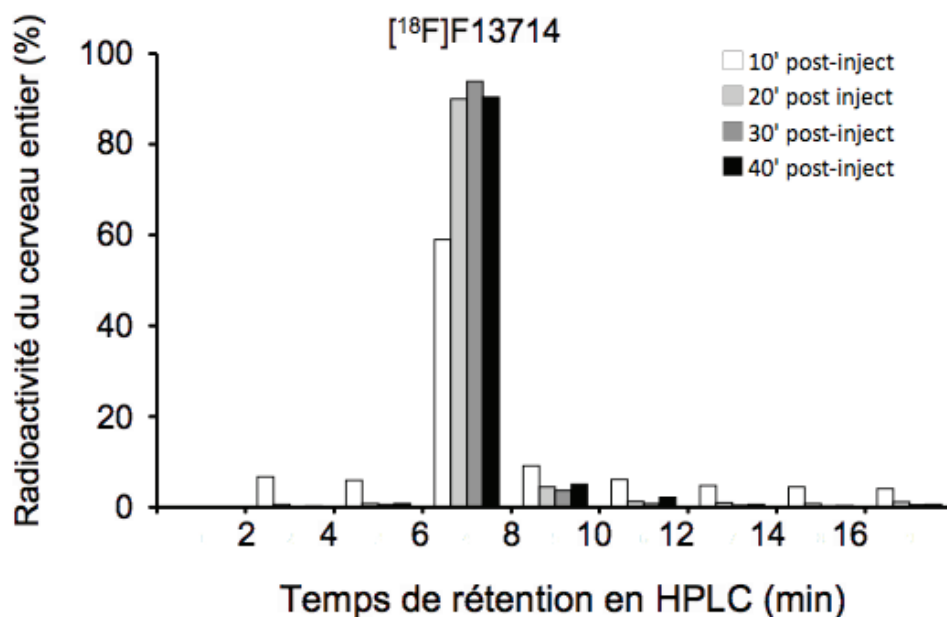


Figure 57 : Radiochromatogramme (séparation par HPLC et comptage radioactif par compteur γ) montrant le temps de rétention de $[^{18}\text{F}]\text{F13714}$ cérébral et son pourcentage par rapport à la radioactivité cérébrale totale.

6) Distribution ex vivo chez le rat

Les images de cerveaux isolés ex vivo de rat, réalisées par microTEP, montrent un marquage dans les régions riches en récepteur 5-HT_{1A} comme le cortex cingulaire et l'hippocampe. On peut aussi voir un marquage non spécifique des régions pauvres en 5-HT_{1A} comme le striatum ou encore dans la partie vasculaire du tronc cérébral en dessous du cervelet (Figure 58). La préinjection de WAY100635, par rapport à l'injection du radiotraceur, diminue le marquage cortical du [¹⁸F]F13714 (expériences faites en double, illustrées Figure 58) mais avec une plus faible influence hippocampique. On peut aussi remarquer une diminution de l'intensité de marquage dans le cervelet (Figure 58). La préinjection de F13714 froid fait totalement disparaître le marquage du [¹⁸F]F13714 (Figure 58).

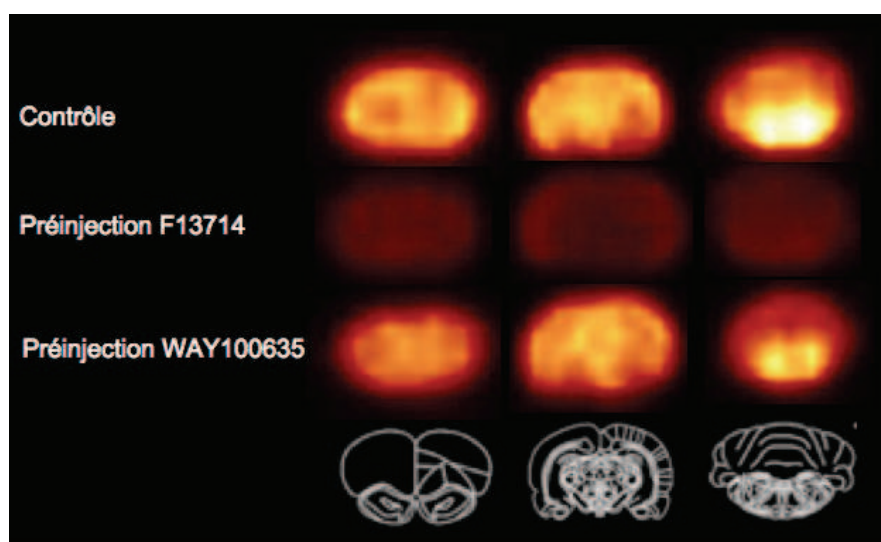


Figure 58 : Images ex vivo du [¹⁸F]F13714 sur cerveau de rat isolé (45 min d'acquisition en microTEP), 20 minutes après l'injection du radiotraceur. La dernière rangée correspond aux coupes anatomiques frontales du cerveau de rat pour les images microTEP. La 1^{ère} rangée correspond aux images microTEP des coupes frontales du rat contrôle. La 2^{ème} rangée correspond aux images microTEP des coupes frontales et transverses du rat après préinjection de F13714, 30 min avant l'injection de [¹⁸F]F13714. Enfin la 3^{ème} rangée correspond aux images microTEP frontales et transverses d'un rat préinjecté avec du WAY100635, 30 minutes avant l'injection du [¹⁸F]F13714 (n=2 rats).

7) Imagerie *in vivo* chez le chat

Les expériences de TEP réalisées chez le chat nous permettent d'observer une bonne pénétration cérébrale du [^{18}F]F13714 (Figure 59). Nous pouvons voir un marquage important dans le cortex cingulaire (Figure 59 A') mais aussi dans l'amygdale (Figure 59 A') et les hippocampes (Figure 59 B'). Il y a également un marquage du cervelet davantage localisé dans le tronc cérébral (Figure 59 C').

Le radiotraceur est rapidement accumulé dans le cerveau, durant les cinq premières minutes après l'injection (Figure 59). La fixation du radiotraceur est importante dans le cortex cingulaire et l'amygdale avec un ratio [cortex cingulaire/cervelet] de 1,5 et un ratio [amygdale/cervelet] de 1,33. Le ratio [hippocampe/cervelet] est de 1,2 (Figure 59).

La préinjection de WAY100635 (500 $\mu\text{g/kg}$, 30 min avant l'injection du [^{18}F]F13714), permet de voir une diminution du marquage du [^{18}F]F13714 (Figure 59). Le ratio [cortex cingulaire préinjection WAY100635/cervelet préinjection WAY100635] est de 1,24. Le ratio [hippocampe préinjection WAY100635/cervelet préinjection WAY100635] est de 1,14 et pour finir le ratio [amygdale préinjection WAY100635/cervelet préinjection WAY100635] est de 1,04. À noter que la diminution de la liaison est plus importante dans l'amygdale et le cortex cingulaire avec un ratio [cortex cingulaire témoin/cortex cingulaire préinjecté WAY100635] et un ratio [amygdale témoin/amygdale préinjecté WAY100635] de 1,5 pour les deux alors que le ratio [hippocampe témoin/hippocampe préinjecté WAY100635] est de 1,3.

La « chasse » réalisée avec une post-injection de WAY100635 (500 $\mu\text{g/kg}$, 15min après l'injection du [^{18}F]F13714) permet aussi de voir une diminution du marquage du [^{18}F]F13714 sur les images TEP (Figure 60) avec des ratios [structures témoins/structures postinjectées WAY100635] de l'ordre de 1,5. Le ratio [cortex cingulaire postinjection WAY100635/cervelet postinjection WAY100635] est de 1,43. Le ratio [amygdale postinjection WAY100635/cervelet postinjection WAY100635] et [hippocampe postinjection WAY100635/cervelet postinjection WAY100635] sont respectivement de 1,25 et 1,14.

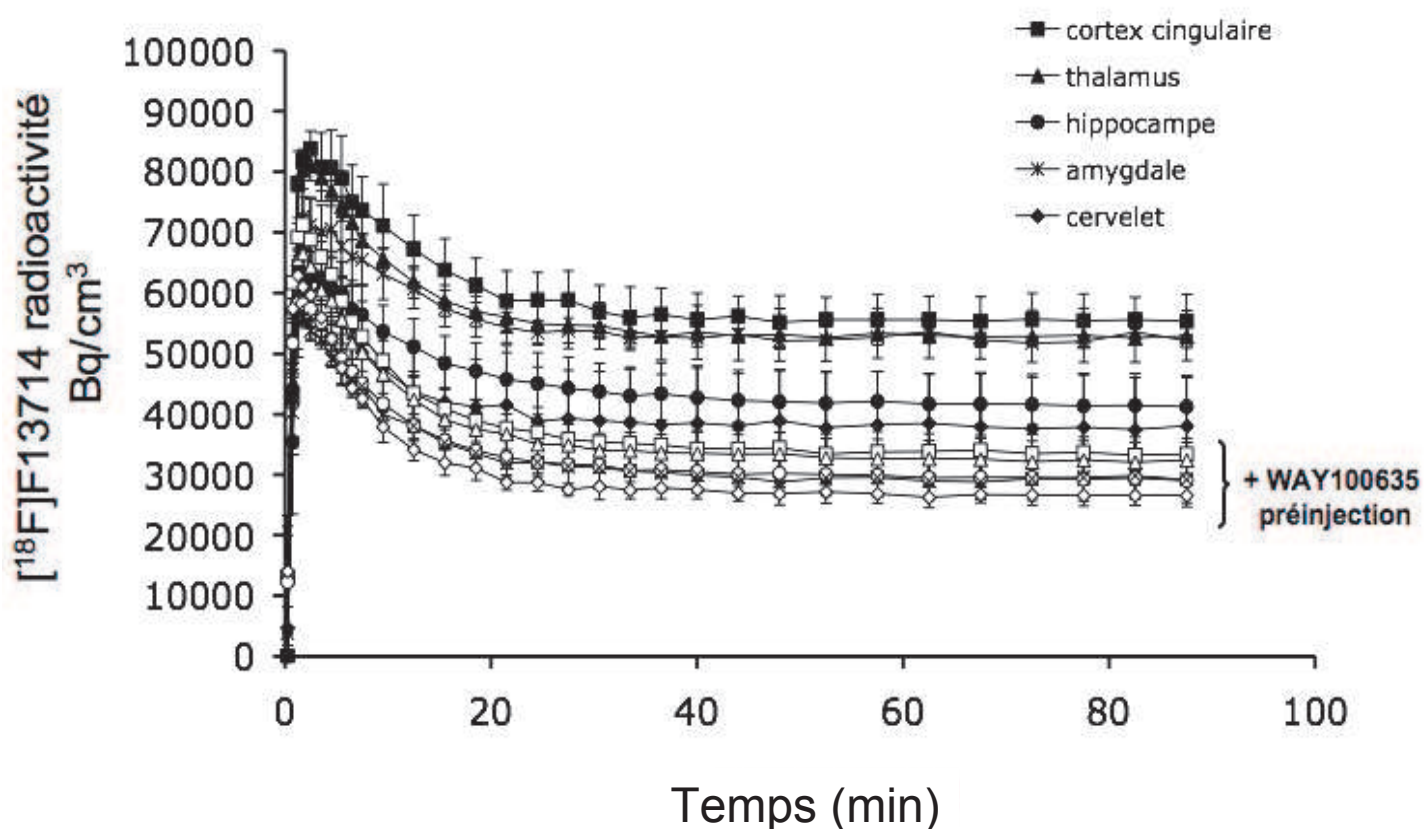
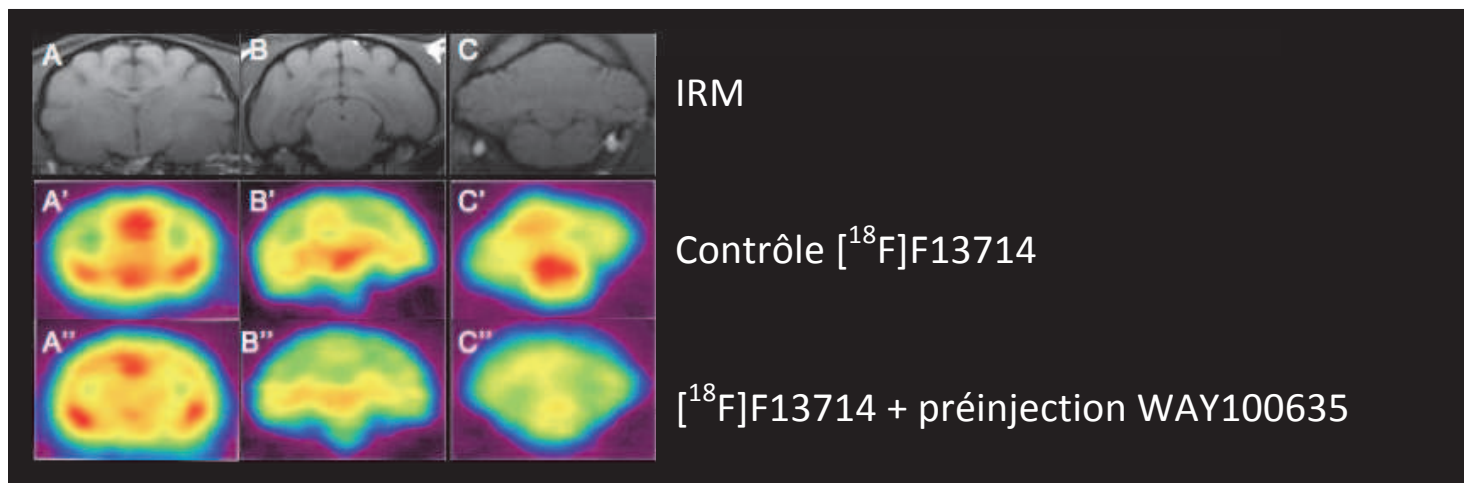


Figure 59 : Acquisitions *in vivo* en TEP du [^{18}F]F13714 chez le chat et courbes de radioactivité en fonction du temps correspondante (acquisition de 90min) avec acquisition contrôle et compétition avec le WAY100635. AA'A '' : IRM, image TEP et image TEP de la compétition avec le WAY100635 correspondante en vue frontale (cortex cingulaire et amygdale). BB'B '' : IRM image TEP et image TEP de la compétition avec le WAY100635 correspondante en vue frontale (hippocampe). CC'C '' : IRM, image TEP et image TEP de la compétition avec le WAY100635 correspondante en vue frontale (cervelet) (n=2 chats). Les courbes en symboles noirs ■ correspondent aux témoins et les courbes en symboles blancs (□) correspondent aux animaux avec préinjection du WAY100635 en intraveineuse.

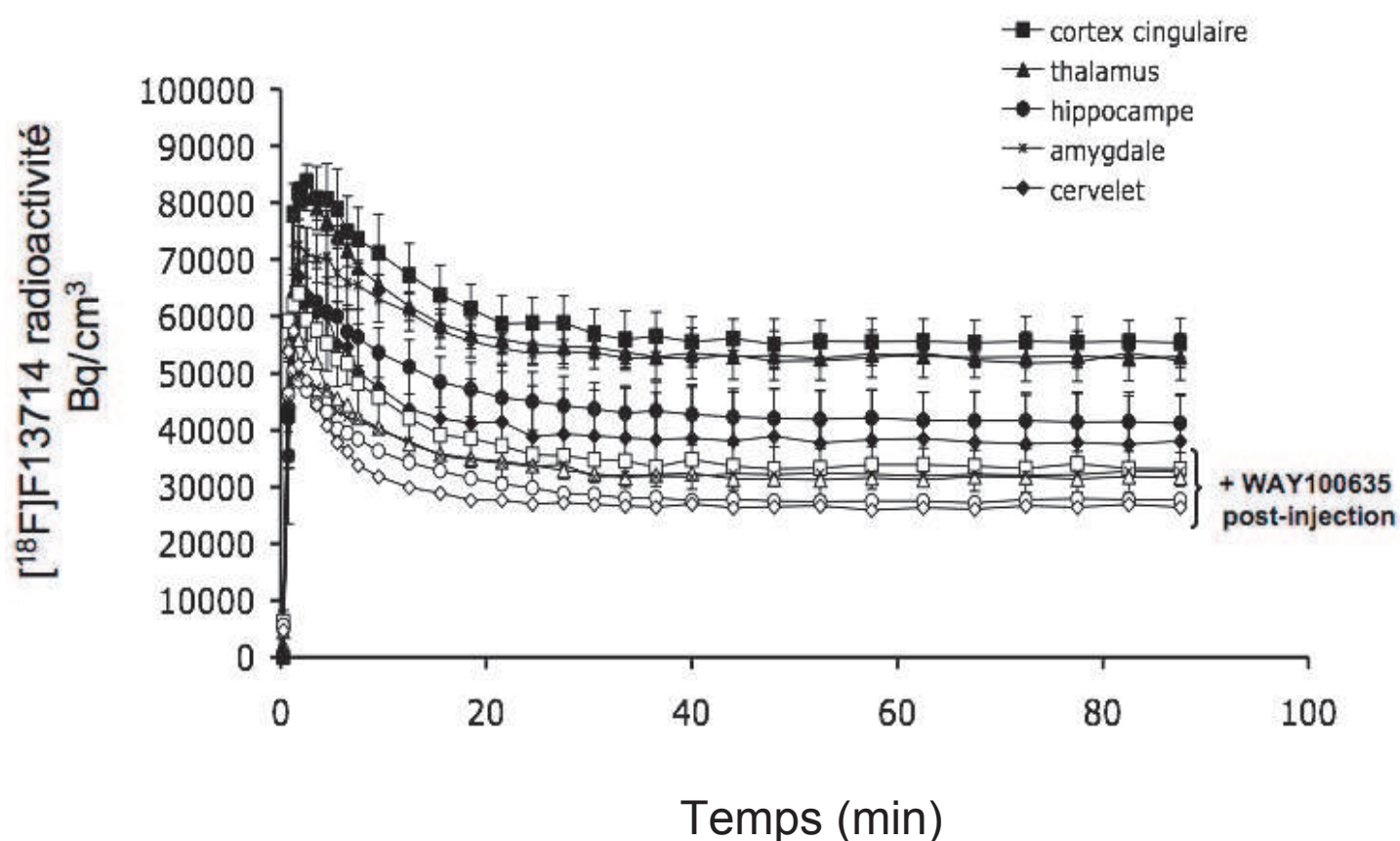
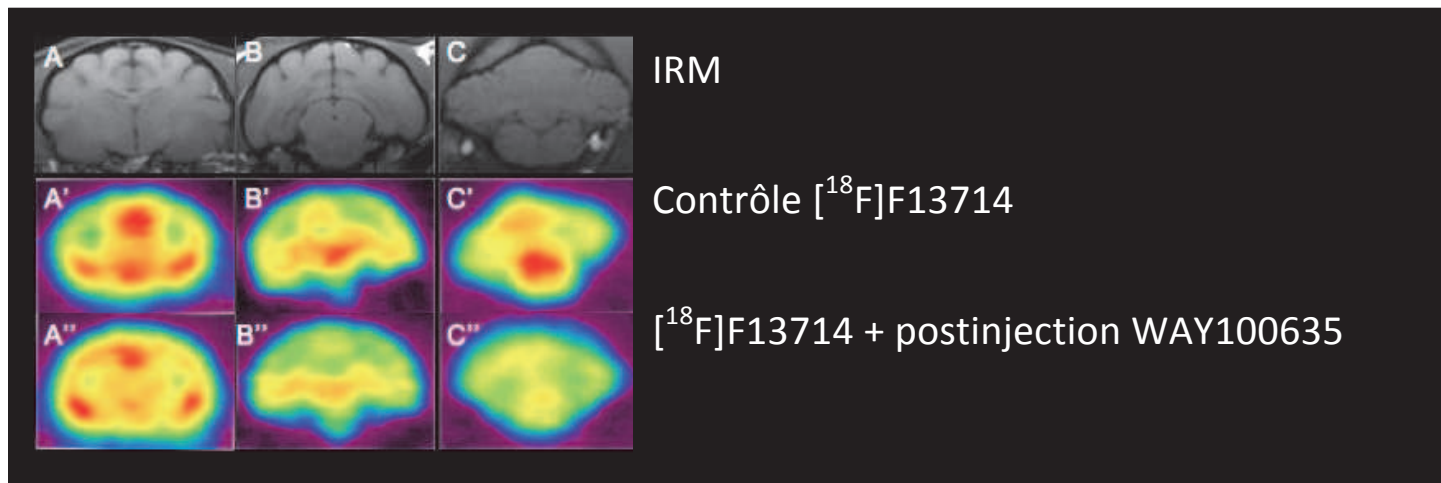


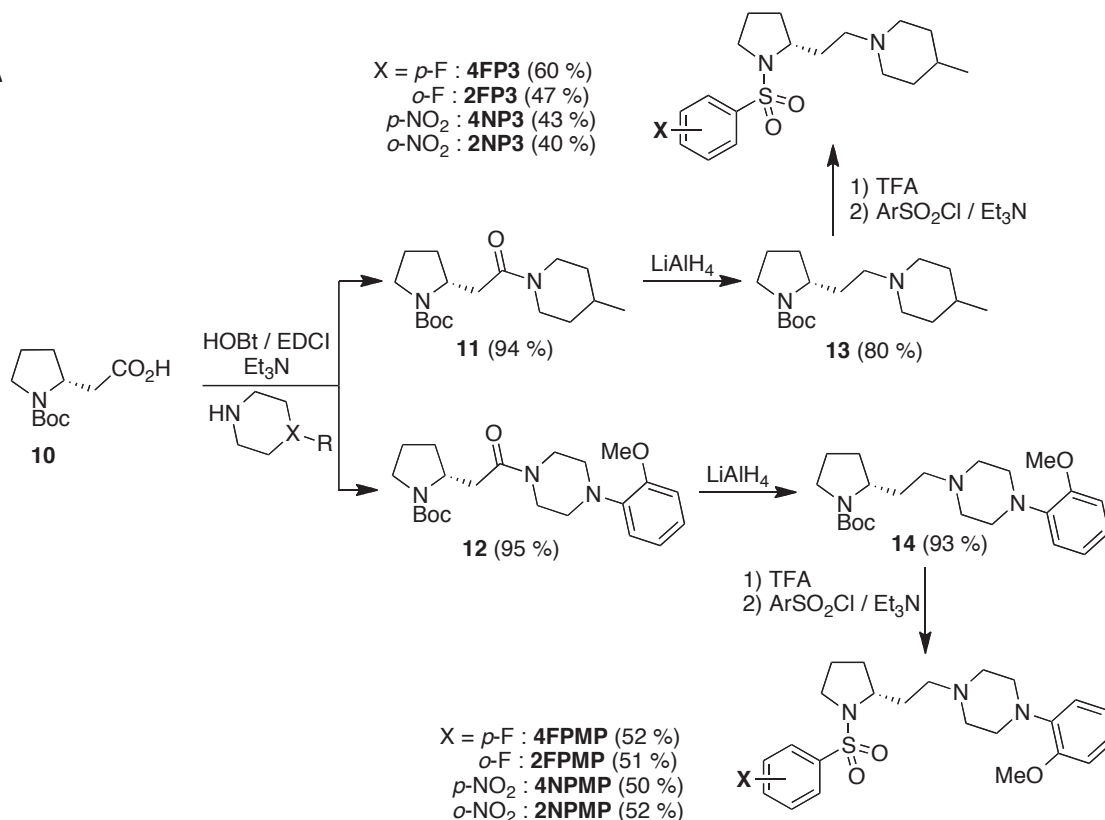
Figure 60 : Acquisitions *in vivo* en TEP du [^{18}F]F13714 chez le chat et courbes de radioactivité en fonction du temps correspondante (acquisition de 90min) avec acquisition contrôle et compétition avec le WAY100635. AA'A'' : IRM, image TEP et image TEP de la compétition avec le WAY100635 correspondante en vue frontale (cortex cingulaire et de l'amygdale). BB'B'' : IRM image TEP et image TEP de la compétition avec le WAY100635 correspondante en vue frontale (hippocampe). CC'C'' : IRM, image TEP et image TEP de la compétition avec le WAY100635 correspondante en vue frontale (cervelet) (n=2 chats). Les courbes en symboles noirs ■ correspondent aux témoins et les courbes en symboles blancs (□) correspondent aux animaux avec postinjection du WAY100635 en intraveineuse.

EVALUATION RADIOPHARMACOLOGIQUE DES ANTAGONISTES DES RECEPTEURS 5-HT₇

1) Synthèse et radiomarquage des molécules 5-HT₇

La *N*-Boc-(D)-homoproline **10** est couplée avec la 4-méthyl-pipéridine ou la *N*-(2-méthoxy phényl)-pipérazine pour conduire, respectivement aux amides **11** ou **12**. Ceux-ci sont ensuite réduits en amines correspondantes (**13** ou **14**) par action de LiAlH₄. Ces composés sont alors déprotégés avec de l'acide trifluoroacétique, et le sel résultant est directement sulfonylé avec le chlorure de sulfonyle correspondant. Les 4 précurseurs nitrés de radiomarquage (**4NP3**, **2NP3**, **4NPMP**, **2NPMP**) ainsi que les 4 molécules froides (**4FP3**, **2FP3**, **4FPMP**, **2FPMP**) sont ainsi finalement obtenues.

A



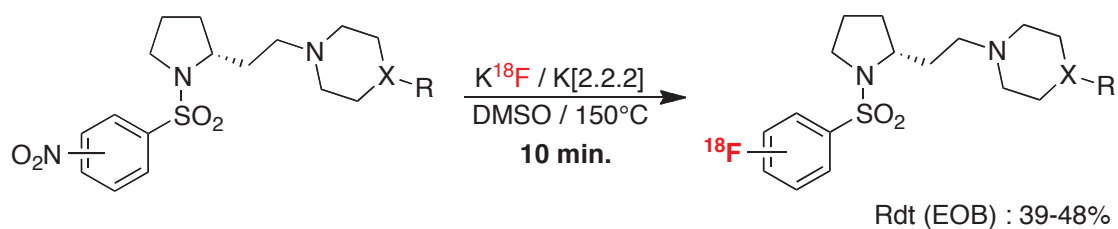
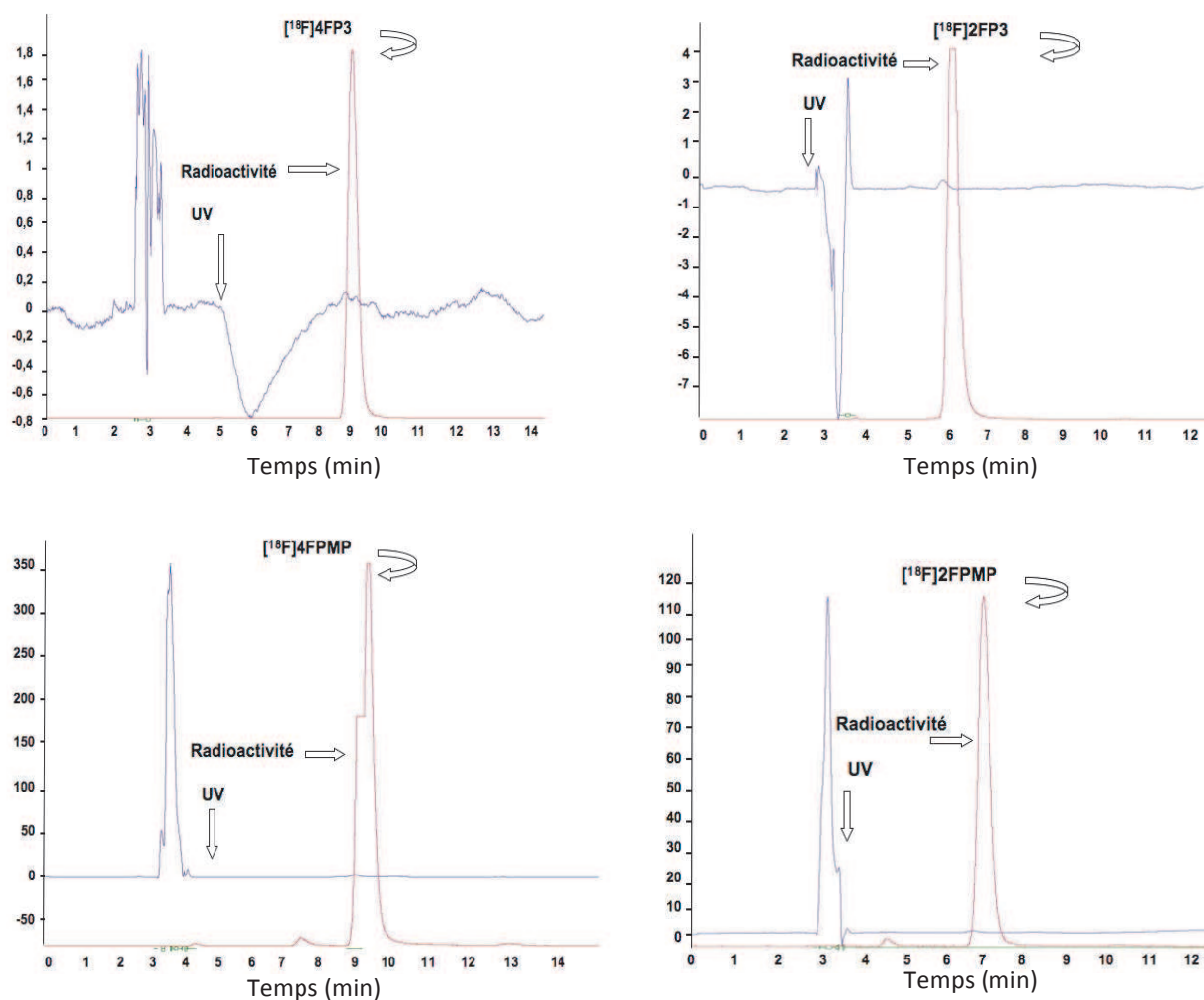
B**C**

Figure 61 : A Schémas de synthèse des précurseurs pour les 5-HT₇. B Etape de radiomarquage des précurseurs. C Chromatogramme final des 4 molécules. L'absorbance UV à 254 nm et la radioactivité montrent une pureté radiochimique supérieure à 99%.

2) Pharmacologie *in vitro*

Les études d'affinités *in vitro* ont été réalisées par la CEREP (www.cerep.fr). Le composé ayant la meilleure affinité pour les 5-HT₇ est le [¹⁸F]2FPMP avec un pK_B de 8,79. Il apparaît également que les membres de la famille FPMP ont une composante agoniste 5-HT_{1A} comme le montre leur EC₅₀ (Figure 62), alors que les composés de la famille FP3 en sont dépourvus. Le log D, reflétant la lipophilie, est compris entre 1,92 et 3,89. La famille 4FPMP est nettement plus lipophile que la famille 4FP3.

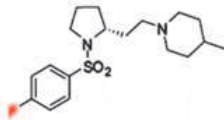
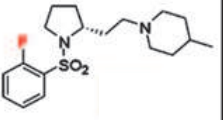
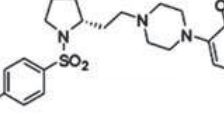
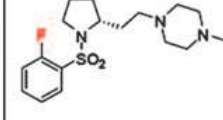
	[¹⁸ F]4FP3	[¹⁸ F]2FP3	[¹⁸ F]4FPMP	[¹⁸ F]2FPMP
				
Log D	1.92	1.43	3.89	3.38
5-HT ₇ affinity (pK _B)	7.85	8.08	8.32	8.79
5-HT _{1A} IC ₅₀	NC	NC	NC	NC
5-HT _{1A} EC ₅₀	NC	NC	1.4 x 10 ⁻⁷	5.8 x 10 ⁻⁸

Figure 62 : Structures chimiques, valeurs du log D et des affinités pour les récepteurs 5-HT₇ et la composante 5-HT_{1A} des quatre radiotraceurs (NC : non calculables).

Le log de D, calculé avec le programme ACD-Lab, reflète la lipophilie de la molécule. Le pK_B est une constante d'affinité représentée par le logarithme négatif de la constante de dissociation K_B caractérisant l'interaction d'un antagoniste pour son récepteur. L'IC₅₀ représente la concentration maximale pour obtenir 50% d'inhibition. Enfin l'EC₅₀ représente la concentration à laquelle on obtient 50% de l'effet maximal.

3) Distribution *in vitro* des antagonistes radiomarqués chez le rat

Les expériences d'autoradiographie *in vitro* chez le rat permettent de voir une fixation cérébrale en accord avec celle des récepteurs 5-HT₇ dans les aires corticales et l'hippocampe (Figure 63). Il est à noter que le [¹⁸F]4FPMP et le [¹⁸F]2FPMP ont une localisation hippocampique plus marquée que les molécules de la série FP3.

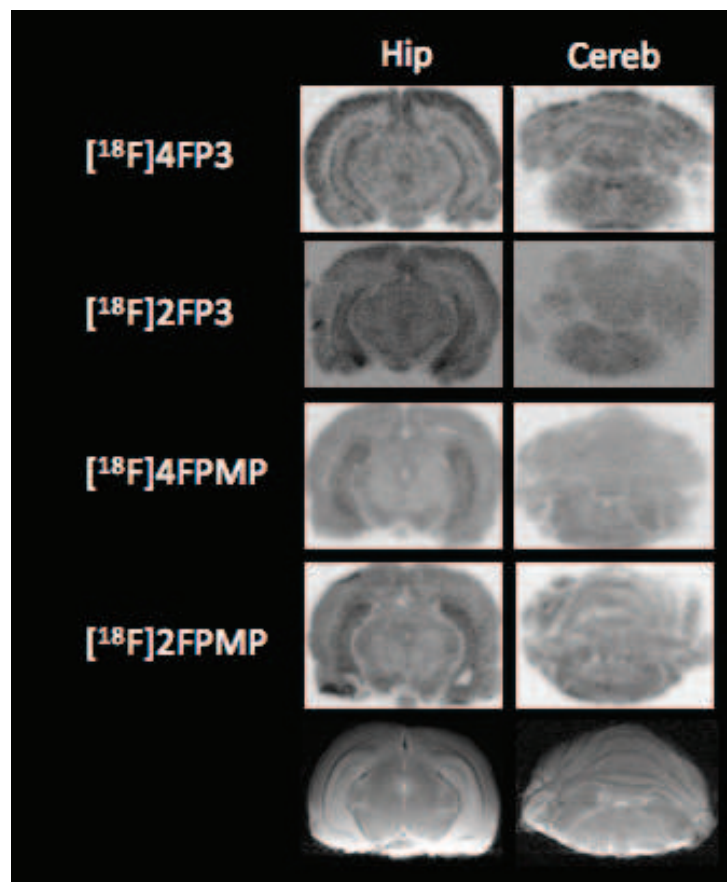


Figure 63 : Distribution *in vitro* des différents radiotraceurs 5-HT₇ chez le rat. En bas, image IRM correspondante (Hip: hippocampe; Cereb: cervelet).

4) Compétition *in vitro* chez le rat

La compétition *in vitro* entre les différents radiotraceurs 5-HT₇ marqués au fluor 18 et la sérotonine (à 1µM) montre que seul le 2FP3 est déplacé de près de 40 % à la fois dans le cortex cingulaire et l'hippocampe (Figure 64). Les trois autres radiotraceurs ne sont pas sensibles à 1µM de sérotonine dans nos conditions expérimentales.

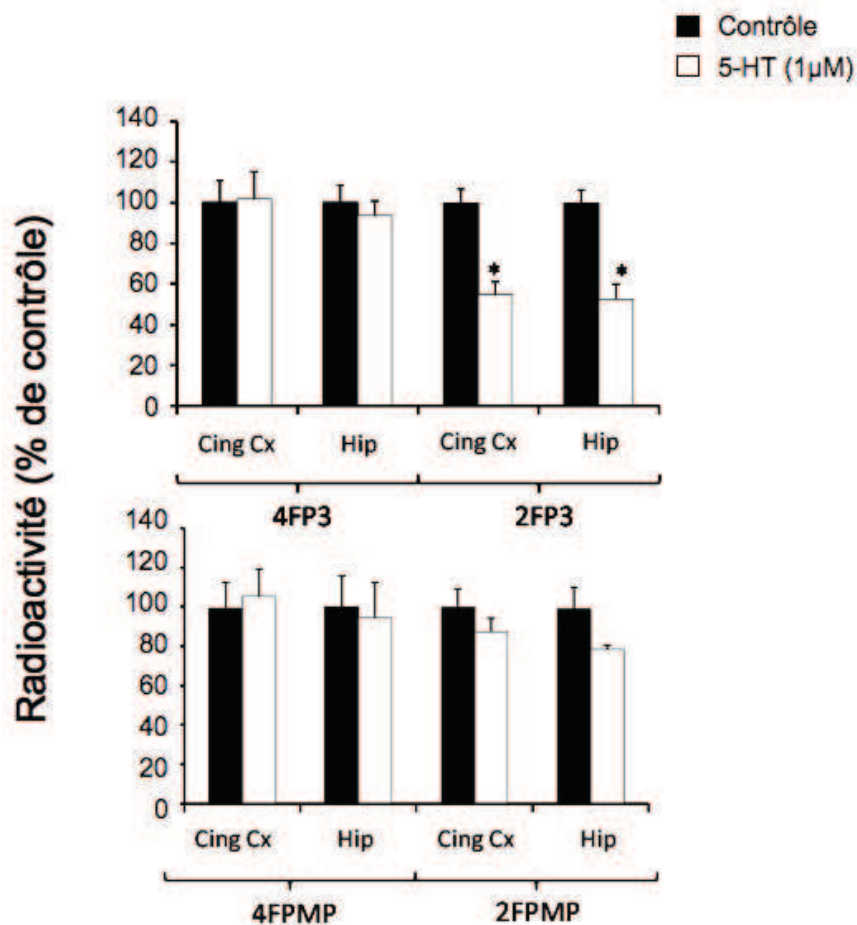


Figure 64 : Histogrammes représentant la compétition entre la sérotonine à 1µM et les différents radioligands 5-HT₇. La famille FP3 est représentée en haut et la famille FPMP est représentée en bas. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle (sans ajout de 5-HT). Cing Cx : cortex cingulaire ; Hip : hippocampe (n=3rats ; * p<0,05)

D'autre part, seule la famille des FP3 a une fixation corrélée avec les différentes concentrations de SB269970, antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT₇ (Figure 65). Une diminution de 70 % du marquage est obtenue avec l'ajout de 1µM de SB269970, à la fois pour le [¹⁸F]4FP3 et le [¹⁸F]2FP3, et ce pour toutes les régions étudiées (cortex cingulaire ; hippocampe (sauf pour le [¹⁸F]4FP3)) (Figure 65). Pour le [¹⁸F]2FP3, on peut observer une diminution du marquage dans le cortex cingulaire mais aussi de l'hippocampe, de 40% et de 60 % pour les concentrations de 10nM et 100 nM de SB269970 respectivement (Figure 65). Pour le [¹⁸F]4FP3, la diminution du marquage de l'hippocampe est respectivement de 20,40 et 60% pour les concentrations de 10nM, 100nM et 1µM. Pour le cortex cingulaire, une diminution significative n'est observée qu'à partir de la concentration de 100nM.

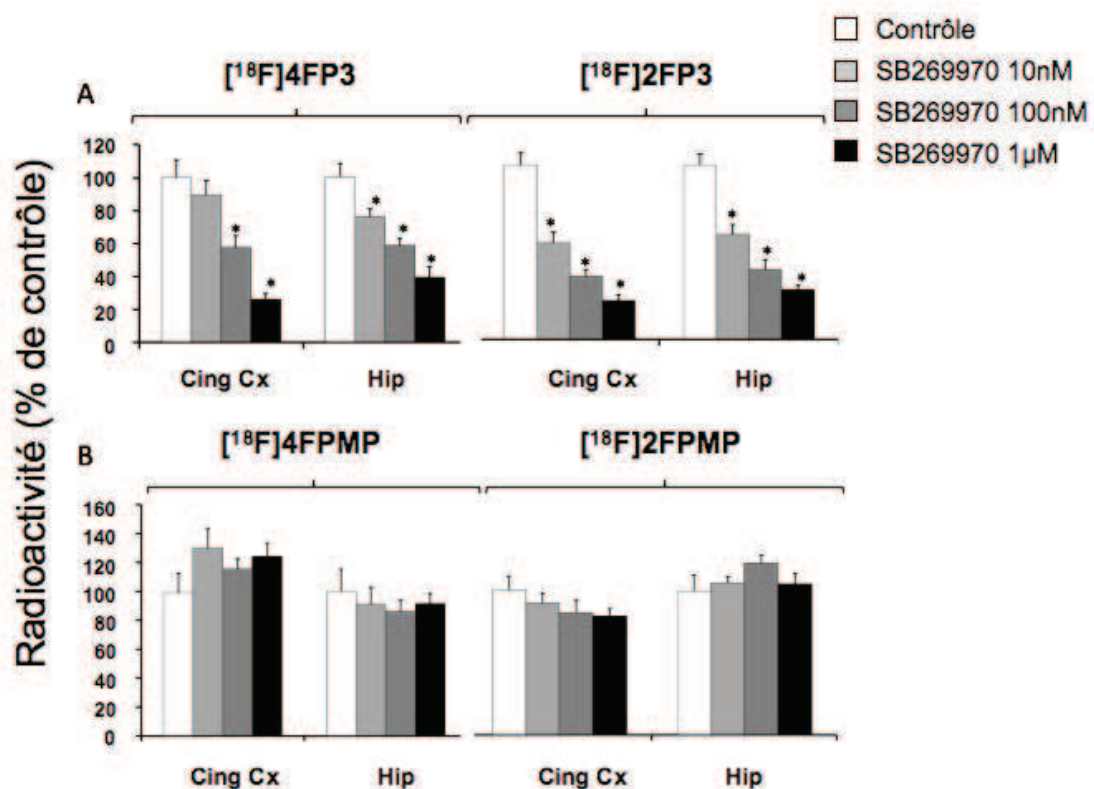


Figure 65 : Histogrammes représentant la compétition entre les différents radioligands 5-HT₇ et le SB269970 à différentes concentrations. La famille FP3 est représentée en haut et la famille FPMP est représentée en bas. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fixation par rapport au témoin dans l'hippocampe et le cortex cingulaire. Cing Cx : cortex cingulaire ; Hip : hippocampe (n= 3 rats ; * p<0,05).

5) Compétition par autoradiographie *ex vivo* chez le rat et microTEP *ex vivo*

a) Études autoradiographiques *ex vivo* de l'effet de la ciclosporine chez le rat

Les expériences d'autoradiographie *ex vivo* réalisées chez le rat montrent une augmentation du marquage pour les quatre radiotraceurs après injection de ciclosporine (Figure 66). Cette augmentation est de l'ordre de 8 fois pour le 4FP3 et de 6 fois pour le 2FP3. Pour la famille FPMP, les résultats montrent une moins forte augmentation du radiomarquage pour le 4FPMP et le 2FPMP avec une augmentation de 3 à 4 fois respectivement.

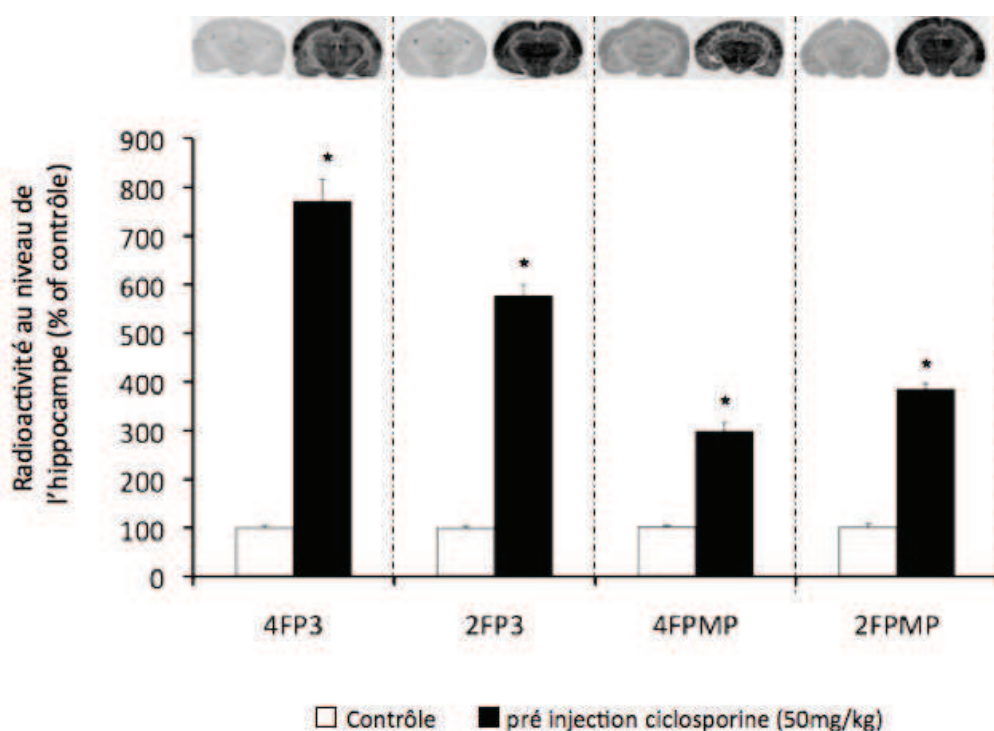


Figure 66 : Histogrammes montrant les effets de la ciclosporine (50mg/kg ; 30min préinjection) sur la fixation des quatre radiotraceurs 5-HT₇ (2mCi). Les valeurs calculées dans l'hippocampe sont exprimées en pourcentage de fixation par rapport au contrôle. Au-dessus des histogrammes, les autoradiogrammes *ex vivo* correspondant au niveau de l'hippocampe pour l'animal contrôle et l'animal préinjecté avec de la ciclosporine (n= 2rats ; * p<0,05).

b) Compétition ex vivo par microTEP chez le rat

Les images de compétition *ex vivo* obtenues chez le rat avec la microTEP permettent d'observer des diminutions du marquage à la fois pour la préinjection avec le SB269970 et pour les préinjections avec les radiotraceurs froids. La diminution du marquage pour le $[^{18}\text{F}]4\text{FP3}$ dans l'hippocampe est de 46% lorsqu'il est en compétition avec le 4FP3 froid et de 42 % lorsqu'il est en compétition avec le SB269970 (Figure 67). Pour le $[^{18}\text{F}]2\text{FP3}$, ces diminutions sont respectivement de 21% et 31 % dans l'hippocampe lorsqu'il est mis en présence de 2FP3 froid ou de SB269970. Pour la famille des FPMP, la diminution du marquage est de 65% et 48%, pour le 4FPMP, de 60% et 56%, pour le 2FPMP, pour les compétitions avec les ligands froids et le SB269970 respectivement (Figure 67).

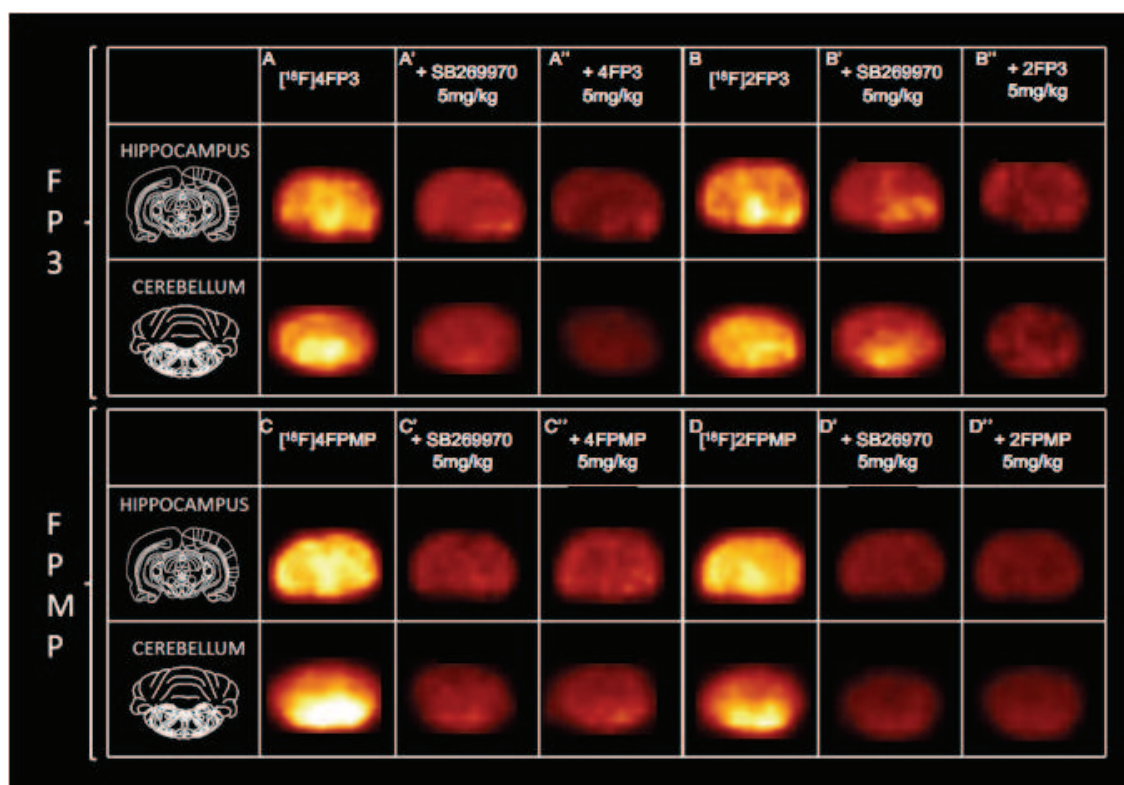


Figure 67 : Images microTEP des expériences *ex vivo* chez le rat réalisé sur les cerveaux prélevés après préinjection intraveineuse du radioligand. La première colonne représente les coupes de l'atlas correspondant aux régions étudiées (hippocampus et cervelet). A : image témoin du $[^{18}\text{F}]4\text{FP3}$, A' : image de la compétition avec le SB269970 (5mg/kg) et A'' : image de la compétition avec le 4FP3 froid (5mg/kg). B : image témoin du $[^{18}\text{F}]2\text{FP3}$, B' : image de la compétition avec le SB269970 (5mg/kg) et B'' : image de la compétition avec le 2FP3 froid (5mg/kg). C : image témoin du $[^{18}\text{F}]4\text{FPMP}$, C' : image de la compétition avec le SB269970 (5mg/kg) et C'' : image de la compétition avec le 4FPMP froid (5mg/kg). D : image témoin du $[^{18}\text{F}]2\text{FPMP}$, D' : image de la compétition avec le SB269970 (5mg/kg) et D'' : image de la compétition avec le 2FPMP froid (5mg/kg).

6) Imagerie *in vivo* chez le chat des quatre radioligands

a) Famille FPMP

L'injection du [^{18}F]4FPMP chez le chat montre un passage de la barrière hémato encéphalique avec un maximum de radioactivité dans le cerveau obtenu pendant les cinq premières minutes (Figure 68). La préinjection d'un antagoniste des récepteurs 5-HT₇, le SB269970, entraîne une légère augmentation de la pénétration du [^{18}F]4FPMP. Les ratios de fixation entre le chat contrôle et le chat préinjecté au SB269970 confirment cela. En effet, les ratios pour le [cortex témoin/cortex après préinjection SB269970], [thalamus témoin/thalamus après préinjection SB269970] et [hippocampe témoin/hippocampe après préinjection SB269970] sont tous les trois de 0,78. Il n'y a pas de changement seulement pour le cervelet, avec un ratio de 0,97. Il est à noter que le même chat est utilisé pour l'expérience contrôle et pour l'expérience avec le prétraitement au SB269970.

L'injection du [^{18}F]2FPMP chez le chat montre aussi un passage cérébral dans les cinq premières minutes. Le prétraitement avec le SB269970 ne démontre pas de diminution sur la courbe de radioactivité en fonction du temps (Figure 68). En effet, les ratios de fixation du [cortex cingulaire témoin/cortex cingulaire préinjecté SB269970], du [thalamus témoin/thalamus préinjection SB269970], de [l'hippocampe témoin/hippocampe préinjection SB269970] et du [cervelet témoin/cervelet préinjection SB269970] sont respectivement de 0,98 ; 0,9 ; 0,92 et 1,01. De la même manière que pour le [^{18}F]4FPMP, le même chat a été utilisé pour l'expérience contrôle et pour l'expérience avec le prétraitement au SB269970.

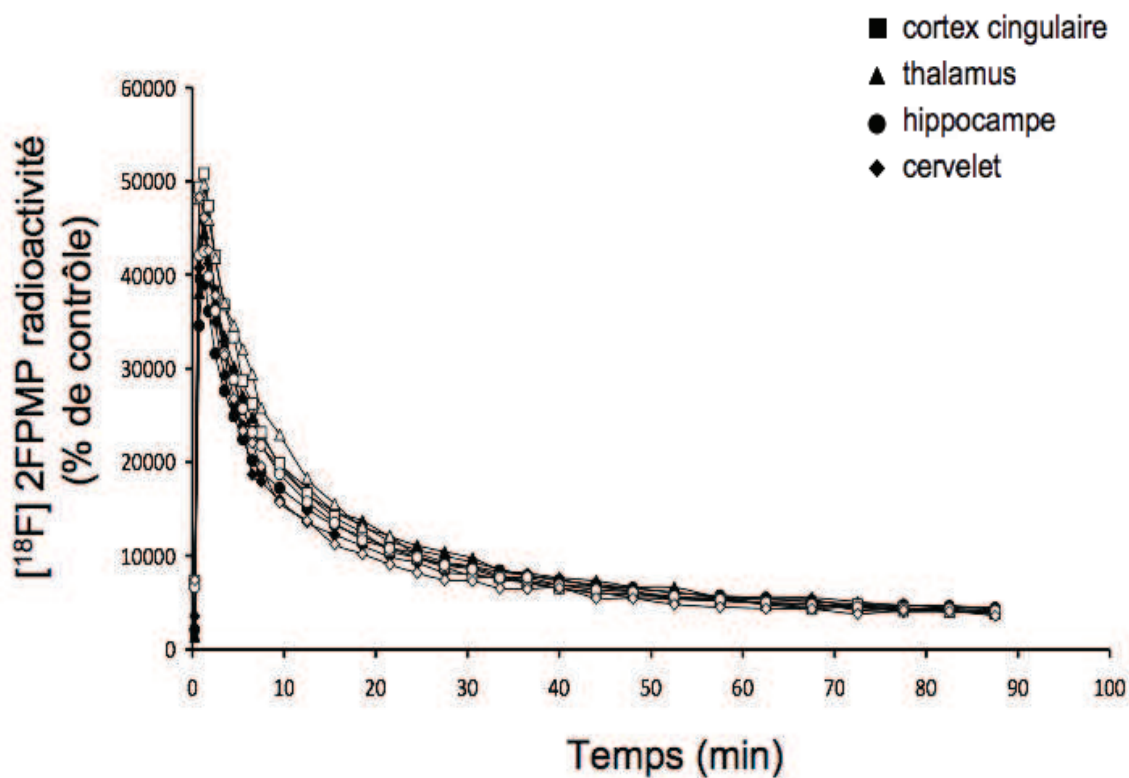
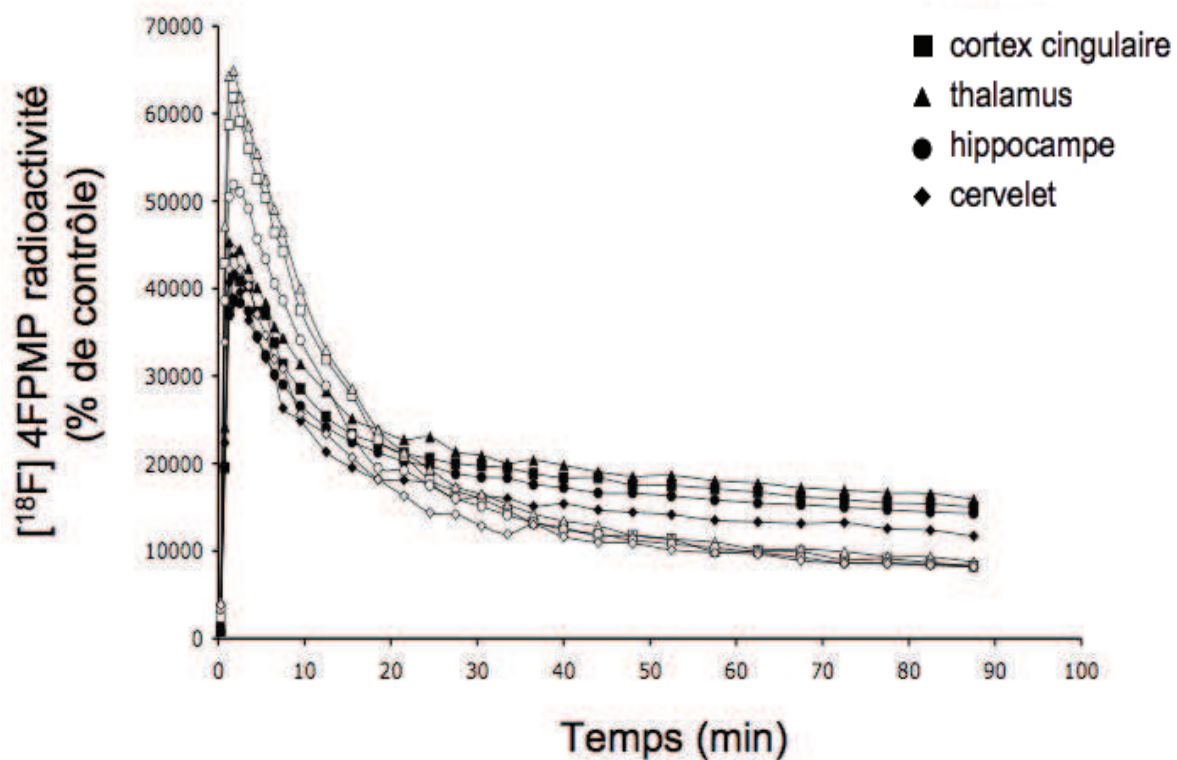
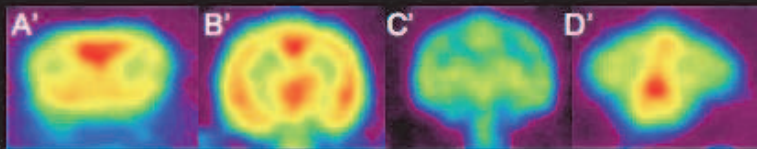


Figure 68 : Courbes de radioactivités en fonction du temps (acquisition de 90 min) avec une acquisition contrôle et une préinjection avec le SB269970 pour le $[^{18}\text{F}]$ 4FPMP et le $[^{18}\text{F}]$ 2FPMP. Les courbes en symboles noirs (■) correspondent aux témoins et les courbes en symboles blancs (□) correspondent aux animaux avec préinjection du SB269970 en intrapéritonéale (3mg/kg).

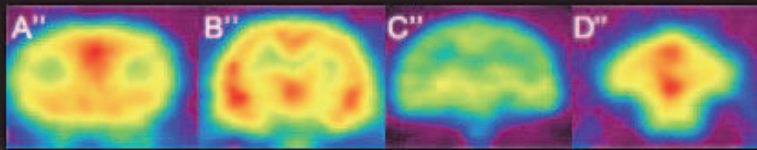
b) Famille FP3 :

L'injection du [^{18}F]4FP3 *in vivo* chez le chat montre une pénétration de la BHE atteignant son maximum dans les cinq premières minutes comme le montre la courbe de radioactivité en fonction du temps. On peut voir une fixation dans le cortex cingulaire (Figure 69 A), le thalamus (Figure 69 B), l'hippocampe (Figure 69 C) et le cervelet (Figure 69 D). Le prétraitement avec le SB269970 en i.p. montre une diminution de la fixation, mais les régions d'intérêt sont toujours marquées (Figure 69 A' B' C' D'). Les ratios de fixation du [cortex cingulaire témoin/cortex cingulaire témoin préinjecté SB269970 i.p.], du [thalamus témoin/thalamus préinjecté SB269970 i.p.], de [l'hippocampe témoin/hippocampe préinjecté SB269970 i.p.] et du [cervelet témoin/cervelet préinjecté SB269970 i.p.] sont respectivement de 1,34 ; 0,96 ; 0,98 et 1. Des résultats similaires sont obtenus avec la préinjection de SB269970 en intraveineuse (Figure 70).

L'injection du [^{18}F]2FP3 *in vivo* chez le chat atteint son maximum dans les cinq premières minutes suivant l'injection comme le montre la courbe de radioactivité en fonction du temps (Figure 71). On peut voir une fixation dans le cortex cingulaire (Figure 71A), le thalamus (Figure 71B), l'hippocampe (Figure 71C) et le cervelet (Figure 71D). Les images TEP obtenues après préinjection i.p. montrent une légère augmentation de la fixation du traceur dans les régions d'intérêts. Les ratios de fixation du [cortex cingulaire témoin/cortex cingulaire préinjection SB269970 i.p.], du [thalamus témoin/thalamus préinjection SB269970 i.p.], de [l'hippocampe témoin/hippocampe préinjection SB269970 i.p.], et [du cervelet témoin/cervelet préinjection SB269970 i.p.] sont de 0,93 ; 0,94 ; 0,95 ; 0,93 respectivement. L'injection en intraveineuse du SB269970 nous permet d'obtenir des résultats totalement opposés. En effet, on peut voir une nette diminution du marquage sur la courbe de radioactivité en fonction du temps (Figure 72). Les ratios de fixation du [cortex cingulaire témoin/cortex cingulaire préinjection SB269970 i.v.], du [thalamus témoin/thalamus préinjection SB269970 i.v.], de [l'hippocampe témoin/hippocampe préinjection SB269970 i.v.], et du [cervelet témoin/cervelet préinjection SB269970 i.v.] sont de 7,06 ; 7,7 ; 7,3 ; 7,3 respectivement.



Témoin



Préinjection SB269970 ip

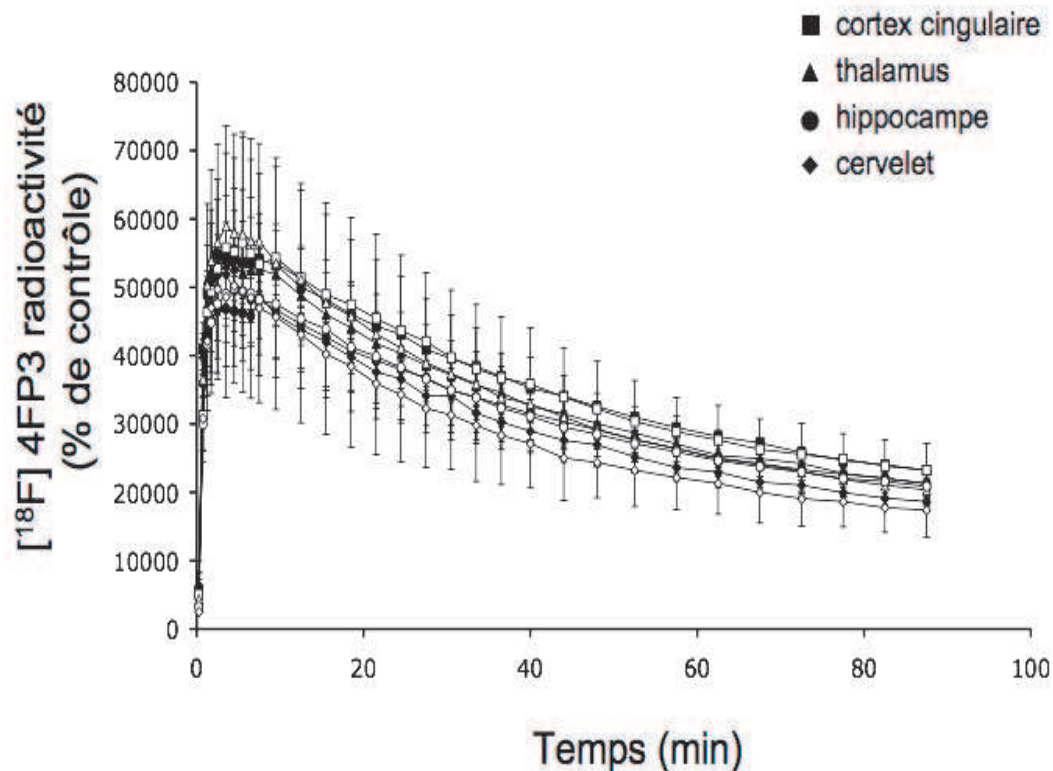
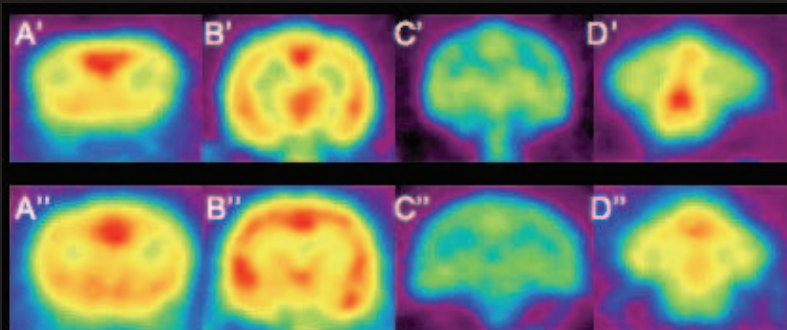


Figure 69 : Acquisitions in vivo en TEP du $[^{18}\text{F}]4\text{FP3}$ chez le chat et courbes de radioactivités en fonction du temps (acquisition de 90 min) avec une acquisition contrôle et une compétition avec le SB269970. A'A'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (cortex cingulaire). B'B'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (thalamus). C'C'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (hippocampe). D'D'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 correspondante en vue frontale (cervelet) ($n = 2$ chats). Les courbes en symboles noirs (■) correspondent aux témoins et les courbes en symboles blancs (□) correspondent aux animaux avec préinjection du SB269970 en intrapéritonéale (3mg/kg).



Témoin

Préinjection SB269970 iv

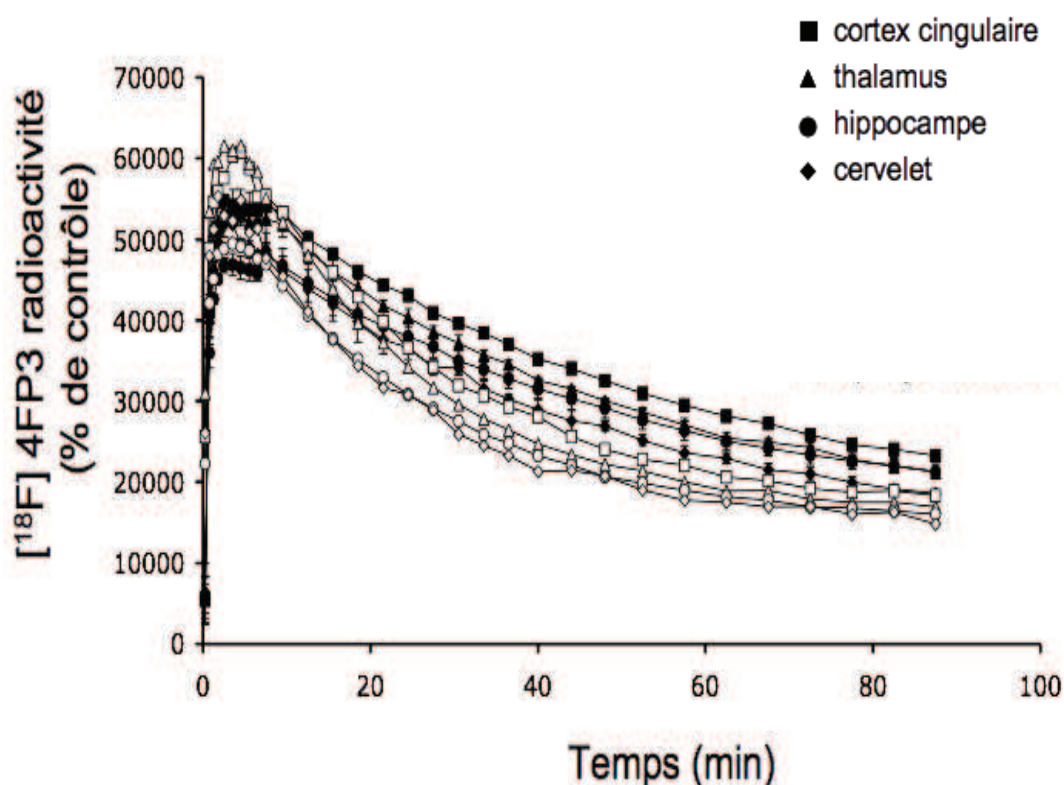
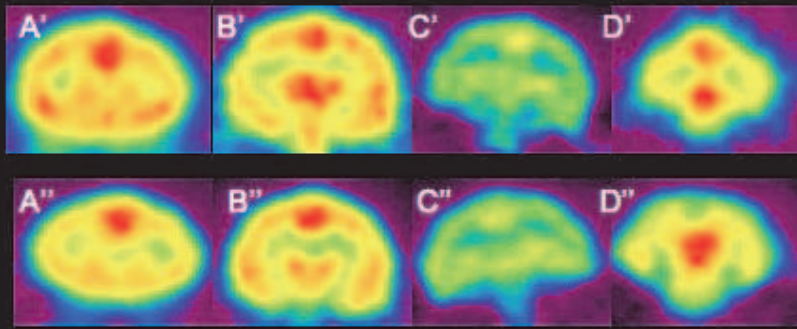


Figure 70 : Acquisitions in vivo en TEP du $[^{18}\text{F}]4\text{FP3}$ chez le chat et courbes de radioactivités en fonction du temps (acquisition de 90 min) avec une acquisition contrôle et une compétition avec le SB269970. A'A'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (cortex cingulaire). B'B'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (thalamus). C'C'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (hippocampe). D'D'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 correspondante en vue frontale (cervelet). (n = 1 chat). Les courbes en symboles noirs (■) correspondent aux témoins et les courbes en symboles blancs (□) correspondent aux animaux avec préinjection du SB269970 en intraveineuse (1,5mg/kg).



Témoin

Préinjection SB269970 ip

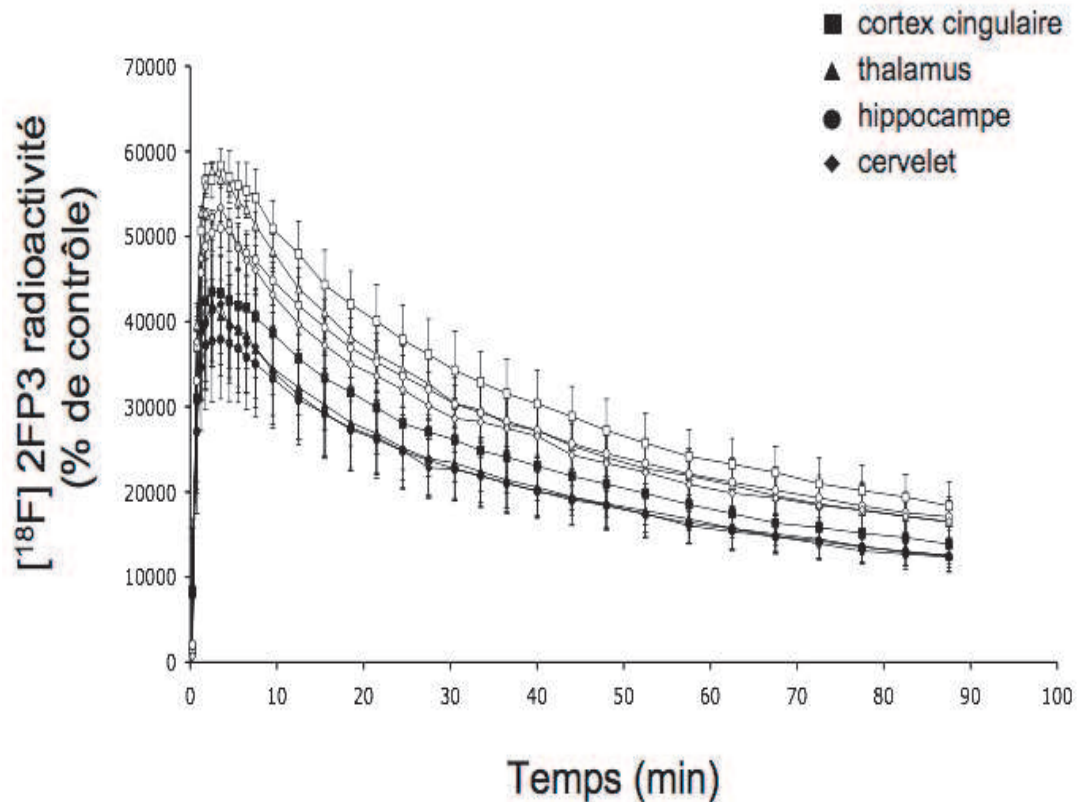
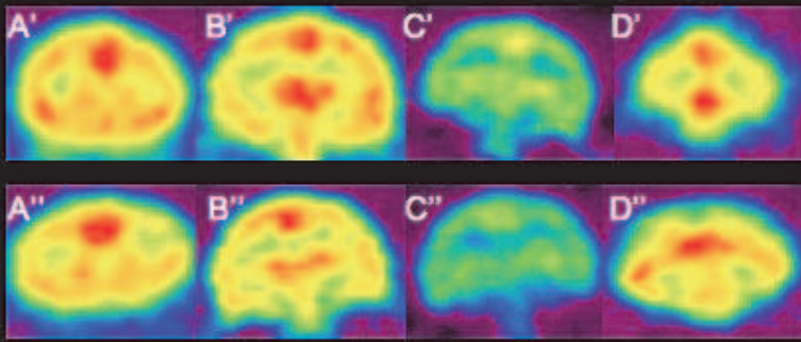


Figure 71 : Acquisitions *in vivo* en TEP du $[^{18}\text{F}]2\text{FP3}$ chez le chat et courbes de radioactivités en fonction du temps (acquisition de 90 min) avec une acquisition contrôle et une compétition avec le SB269970. A'A'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (cortex cingulaire). B'B'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (thalamus). C'C'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (hippocampe). D'D'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 correspondante en vue frontale (cervelet). (n= 2 chats). Les courbes en symboles noirs (■) correspondent aux témoins et les courbes en symboles blancs (□) correspondent aux animaux avec préinjection du SB269970 en intrapéritonéale (3mg/kg).



Témoin

Préinjection SB269970 iv

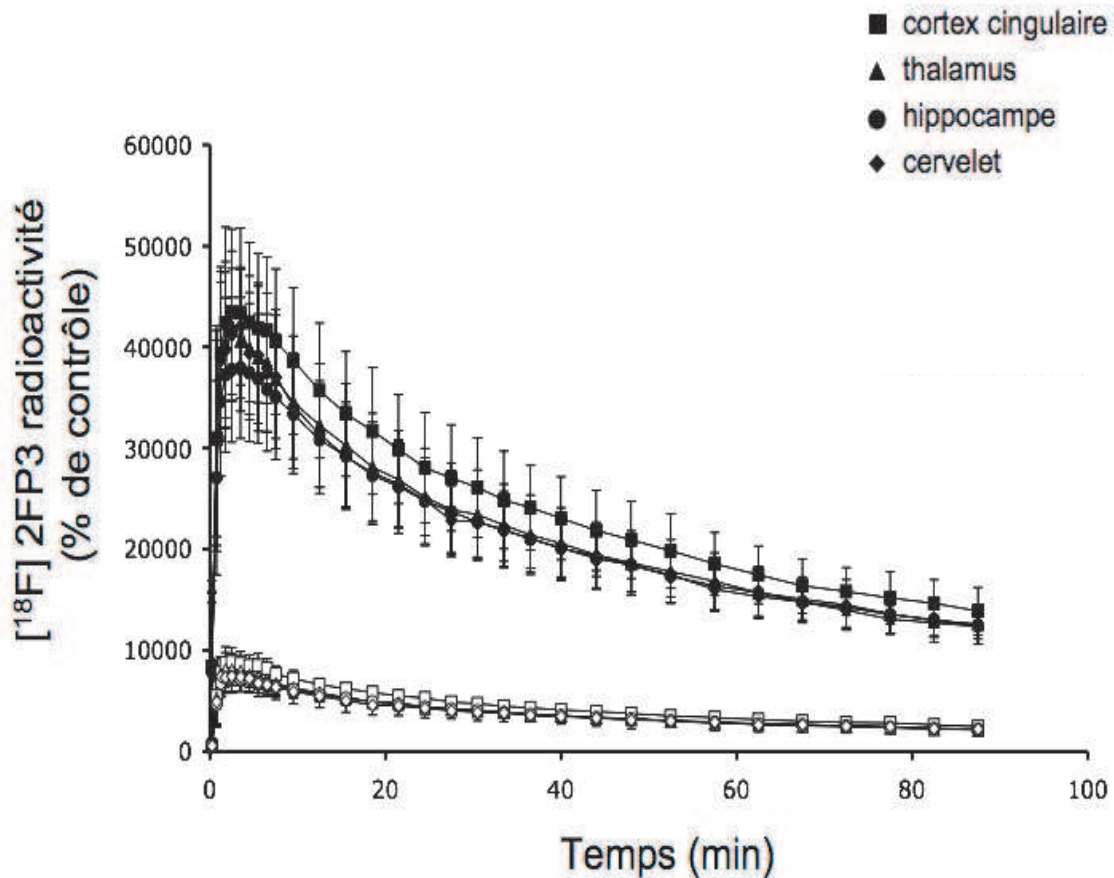


Figure 72 : Acquisitions *in vivo* en TEP du $[^{18}\text{F}]2\text{FP3}$ chez le chat et courbes de radioactivités en fonction du temps (acquisition de 90 min) avec une acquisition contrôle et une compétition avec le SB269970. A'A'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (cortex cingulaire). B'B'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (thalamus). C'C'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 en vue frontale (hippocampe). D'D'' : image TEP et image TEP lors de la compétition avec le SB269970 correspondante en vue frontale (cervelet). (n = 2 chats). Les courbes en symboles noirs (■) correspondent aux témoins et les courbes en symboles blancs (□) correspondent aux animaux avec préinjection du SB269970 en intraveineuse (1,5mg/kg).

6) Métabolites cérébraux chez le rat

Nous avons vérifié si le [^{18}F]2FP3 est métabolisé dans le cerveau de rat. Cette expérience a été réalisée sur quatre rats. Les résultats montrent que la majeure partie de la radioactivité est due au [^{18}F]2FP3. En effet, on retrouve 94% du [^{18}F]2FP3 à 10 min après l'injection, 96% à 20 min après l'injection, 95% à 30 min après l'injection et 96% de [^{18}F]2FP3 à 40 min après l'injection (Figure 73). Cette expérience a été réalisée en double.

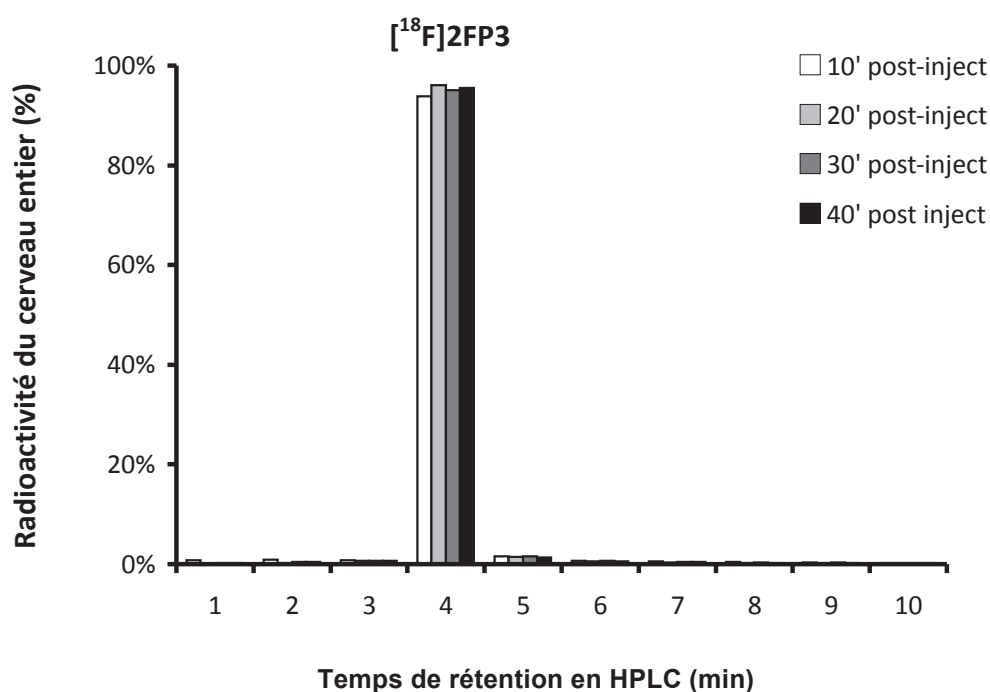


Figure 73 : Radiochromatogramme (séparation par HPLC et comptage radioactif) montrant le temps de rétention de [^{18}F]2FP3 cérébral et son pourcentage par rapport à la radioactivité cérébrale totale (hippocampe) (n= 2 rats par temps).

DISCUSSION

Partie 1 : APPORTS DES AGONISTES DANS L'IMAGERIE DES RECEPTEURS 5-HT_{1A}

Les récepteurs 5-HT_{1A} sont largement étudiés, tant sur modèle animal que chez l'homme car ils sont impliqués dans bon nombre de fonctions physiologiques et de perturbations du système nerveux central, essentiellement dans les troubles de l'humeur (Borg, 2008 pour revue). En effet, certains ligands des récepteurs 5-HT_{1A} sont actuellement proposés comme médicaments à visée centrale, bien que la plupart des molécules soient en phase de recherche clinique.

Parmi les molécules à visée 5-HT_{1A}, seule la buspirone (ex-Buspar® et actuellement générique) dispose d'une AMM en France pour les prises en charge de l'anxiété, en alternative aux benzodiazépines couramment utilisées. Son mécanisme d'action serait médiée par ses effets agonistes sérotoninergiques 5HT_{1A}, bien que la molécule possède également des propriétés antagonistes dopaminergiques D2 et alpha2 adréno-lytiques. D'autres molécules ne sont pas commercialisées, mais sont encore étudiées dans le cadre de protocoles de recherche clinique (en phase 2 ou en phase 3, cf www.clinicaltrials.gov).

Les molécules de la famille « azapirone », sont des agonistes partiels à haute affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A}, et ont été proposées il y a une dizaine d'années comme anxiolytiques et antidépresseurs (Chessick et al., 2006). En effet, ces molécules diminuent globalement la neurotransmission sérotoninergique avec, d'une part, un effet antagoniste postsynaptique dans l'hippocampe et le cortex cérébral et, d'autre part, via l'inhibition de la décharge neuronale par une action agoniste sur les autorécepteurs somatodendritiques.

D'autres molécules agonistes partiels ou antagonistes 5-HT_{1A} ont été récemment étudiées pour leurs propriétés « procognitives » et aussi au niveau d'effets indésirables de la maladie d'Alzheimer chez l'homme dans des protocoles de phase 3. Ainsi, des études avec la tandospirone, agoniste partiel, montre une efficacité sur l'agressivité et l'agitation des patients (Sato et al., 2007). Dans une autre étude, l'injection chronique d'aripiprazole, agoniste partiel des récepteurs 5-HT_{1A}, montre une efficacité dans le traitement des psychoses associées à la maladie

d'Alzheimer (Mintzer et al., 2007). Enfin, l'équipe de Samanin, en 1998, a démontré que le 8-OHDPAT, agoniste des récepteurs 5-HT_{1A}, permettait de renverser l'effet promnésique de la scopolamine (Carli et al., 1997). Il est à noter que d'autres auteurs ont montré des effets procognitifs comparables avec un antagoniste 5-HT_{1A}, le lecozotan (Schechter et al., 2005). Les mécanismes d'action évoqués diffèrent mais pour l'instant, aucune théorie précise ne permet de déterminer le mode d'action des agonistes et des antagonistes (Meneses and Perez-Garcia., 2007). En termes d'efficacité clinique, aucune stratégie thérapeutique ne se démarque pour l'instant sur ces petits groupes de patients.

Enfin, certaines équipes proposent l'utilisation des agonistes 5-HT_{1A} comme antidépresseurs (De Vry, 1995 pour revue). Ainsi, dans une revue de 2003, Blier et Ward proposaient un rôle potentiel des récepteurs 5-HT_{1A} dans le traitement de la dépression (Blier and Ward, 2003). En 2007, la caractérisation neurochimique, électrophysiologique et comportementale du F15599 démontre un effet potentiellement antidépresseur pour cet agoniste 5-HT_{1A} (Maurel et al., 2007). Cependant, aucune étude clinique utilisant le F15599 n'a été publiée pour l'instant dans cette indication.

Il apparaît donc, au-delà du ciblage des récepteurs de la famille 5-HT_{1A}, que la propriété d'antagoniste ou d'agoniste est cruciale. Celles-ci impliquent les protéines G, pivot moléculaire dans la transduction du signal de nombreux récepteurs.

Les protéines G sont un point de convergence dans la transmission du signal d'une variété de messagers primaires (incluant les monoamines et les récepteurs des membranes) dans une série d'événements cellulaires (incluant les enzymes effectrices de second messenger intracellulaire et les canaux ioniques). Ainsi, parmi leurs nombreuses implications thérapeutiques (Figure 74), il a été montré l'importance de la régulation du couplage des protéines G dans la physiopathologie des désordres psychologiques, ainsi que dans le mécanisme d'action des antidépresseurs (Avissar, 1988 ; Avissar and Schreiber, 1992, 2002, 2006 ; Schreiber and Avissar, 2007 ; Pejchal et al., 2002).

GPCR-G protein coupling: alterations in mood disorders			
Disorder	Bipolar disorder (Mania)	Major depression	Winter depression SAD
G protein function	Increased β -Gs and β -Gi	Decreased β -Gs and β -Gi	
G protein level	Increased Gs α and Gi α	Decreased Gs α and Gi α	Decrease Gs α and Gi α
Normalization of G protein measure	Lithium	Antidepressants ECT	Light therapy
Beta-arrestin measures		Decreased β -arrestin 1	
Normalization of beta- arrestin measures		Antidepressants	
GRK		Decreased GRK2	
Normalization of GRK measures		Antidepressants	
Susceptibility gene	G(olf) GRK3	G β -3	

Figure 74: Tableau récapitulatif de l'action des récepteurs couplés aux protéines G dans les troubles de l'humeur (d'après Avissar et Schreiber, 2006).

Il est à noter que les protéines G interviennent dans la discrimination des antagonistes et des agonistes. En effet, les récepteurs couplés aux protéines G existent sous deux conformations. La première conformation comprend les récepteurs à haute affinité qui sont couplés de manière active aux protéines G (et qui sont considérés comme étant « fonctionnels »). La deuxième conformation comprend les récepteurs à basse affinité qui ne sont pas couplés de manière active. Les molécules agonistes et antagonistes permettent de faire cette distinction entre haute affinité et basse affinité. En effet, les antagonistes se fixent de manière égale sur les récepteurs couplés ou non et de manière indistincte. Ils sont considérés comme « silencieux » dans la mesure où ils n'induisent pas la transmission d'un message moléculaire. Par contre, les agonistes (qui miment les neurotransmetteurs endogènes) ne se fixent que sur les récepteurs couplés aux protéines G permettant la transduction du message biologique (Emerit et al., 1990 ; Gether and Kobilka, 1998).

Dans ce contexte, un radiotracer agoniste permettrait de visualiser et quantifier spécifiquement les récepteurs fonctionnels, rejoignant ainsi la notion « d'imagerie fonctionnelle ». À l'inverse, un antagoniste radiomarqué permet de visualiser l'ensemble des récepteurs, qu'ils soient couplés ou non-couplés aux protéines G. De plus, l'imagerie d'un agoniste radiomarqué permettrait de mettre en évidence indirectement des fluctuations des concentrations extracellulaires de la sérotonine. En effet, la sérotonine (de comportement agoniste) ne se fixe que sur les récepteurs sérotoninergiques de haute affinité et couplés aux protéines G, incluant une partie des récepteurs 5-HT_{1A}. Une augmentation significative de la

sérotonine extracellulaire entraînerait le déplacement d'un radiotraceur fixé sur les récepteurs sérotoninergiques (si son affinité n'est pas trop élevée), et ce d'autant plus facilement s'il s'agit d'un agoniste ciblant la même sous-population de récepteur que le neurotransmetteur (Patterson et al., 2010). Ce mécanisme peut être illustré *in vitro* : l'ajout de 5-HT après radiomarquage des récepteurs par un antagoniste, n'effacera pas tout le marquage car la fixation sur les récepteurs non-couplés ne sera pas touchée, alors que l'ajout de 5-HT après radiomarquage par un agoniste effacera entièrement le marquage du traceur (voir Figure 75).

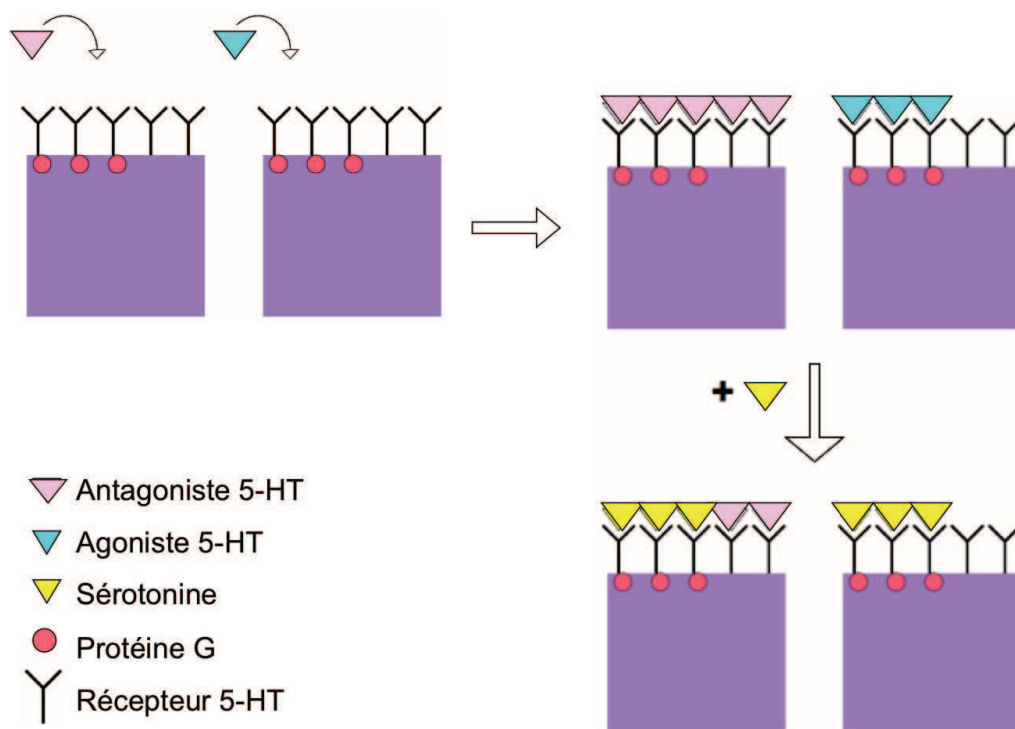


Figure 75 : Schéma représentant la fixation de molécules agonistes et antagonistes 5-HT_{1A} sur les récepteurs de la sérotonine ainsi que la compétition avec la sérotonine.

Tous ces éléments montrent que des radiotraceurs agonistes des récepteurs (5-HT_{1A} dans notre cas) seraient tout à fait complémentaires aux nombreux antagonistes radiomarqués utilisés actuellement en TEP.

Ainsi, un agoniste TEP des récepteurs 5-HT_{1A} permettrait une imagerie moléculaire inédite dans l'exploration des désordres neuropsychiatriques et de leurs thérapies. L'imagerie *in vivo* d'un radiotraceur agoniste comparée à celle d'un antagoniste

permettrait de quantifier localement le statut fonctionnel des récepteurs 5-HT_{1A} chez des patients au cours de l'évolution de leur pathologie, voire au cours de leur traitement. De plus, l'imagerie quantitative des récepteurs 5-HT_{1A} permettrait aussi d'étudier les interactions, en termes de taux d'occupation, de couplage ou de libération de sérotonine, avec les médicaments-candidats 5-HT_{1A} (Gozlan et al., 1995).

Différents radiotraceurs antagonistes existent déjà et sont utilisés couramment en imagerie clinique. Mais la recherche d'agonistes radiomarqués 5-HT_{1A} pour la TEP a été moins couronnée de succès. En effet, de nombreux échecs (essentiellement radiopharmacologiques et non radiochimiques) ont été rapportés dans la littérature. L'explication la plus souvent invoquée tient à la cinétique de fixation d'un agoniste sur son récepteur. L'agoniste se fixe de manière transitoire sur le récepteur et entraîne rapidement le découplage de la protéine G. Ce dernier fait passer le récepteur à un état de basse affinité, libérant ainsi l'agoniste. Ce phénomène d'homéostasie a pour but d'éviter une trop longue stimulation d'un récepteur par un agoniste. Cependant, ce mécanisme est défavorable à l'imagerie puisque la fixation d'un radioligand sera trop fugace pour l'enregistrement d'une image. En 1998, l'OSU191 a été le premier agoniste radiomarqué au carbone 11 pour les récepteurs 5-HT_{1A} (Kassir et al., 1998). Cependant, il n'y a pas eu d'essais biologiques. Il y a eu d'autres essais infructueux avec le 8-OHPPSMAT (Matsubara et al., 1991) et le 8-SMeDPAT (Stockmaier et al., 1998). Le LY274601, quant à lui, permet une imagerie *in vitro*, mais a une métabolisation rapide et un marquage trop peu spécifique pour l'imagerie *in vivo* (Suehiro et al., 1998). En 1997, l'équipe de Lima s'est intéressée au S14506, un agoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{1A} avec un K_d de 0,15nM (Lima L et al., 1997). Cependant la comparaison entre le [³H]8-OHDPAT et le [³H]S14506 a montré que les deux agonistes ne reconnaissent pas exactement le même type de récepteurs liés à la protéine G. De plus, des études de compétitions avec le GTP et le Gpp(NH)p ont montré l'absence d'inhibition du marquage spécifique du S14506. Le [³H]S14506 est donc un agoniste se fixant à la fois sur les récepteurs couplés et non-couplés aux protéines G (Gozlan et al., 1995 ; Lima et al., 1997 ; Milligan et al., 2001). Ceci limite son intérêt pour une imagerie spécifique des récepteurs fonctionnels. Le S14506 a tout de même été radiomarqué au carbone 11 et au fluor 18 (Lu et al., 2010). Les résultats *in vivo*

montrent que le S14506 présente une bonne biodisponibilité cérébrale mais avec trop peu de marquage spécifique pour une utilisation en TEP (Lu et al., 2010) .

Notre équipe avait également tenté de marquer un agoniste pour les récepteurs 5-HT_{1A}. Il s'agissait du [¹¹C]méthoxyphényl-thiochromane. Cet agoniste a une double action sur les récepteurs 5-HT_{1A} avec une action présynaptique agoniste et une action postsynaptique antagoniste. Le marquage a été réalisé avec succès, cependant, les expériences *in vivo* n'ont montré aucune spécificité de fixation, conduisant à l'abandon de la molécule (Zimmer et al., 2003).

À l'heure actuelle, l'équipe qui a le plus progressé dans la recherche de radiotracer agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} est celle de J.S. Dileep Kumar à l'université de Columbia. Leur première molécule marquée a été le [¹¹C]MPT. Cette molécule avait une très bonne spécificité *in vivo* chez le singe cependant elle avait une élimination très lente et une fraction libre non-mesurable dans le plasma (Cheng et al., 2007). L'équipe a proposé le radiomarquage de l'analogue méthoxyphényle, appelé [¹¹C]MMT. Ce radiotracer passe la BHE, mais montre un faible marquage spécifique et une clairance cérébrale trop rapide ce qui le rend inutilisable en imagerie TEP (Prabhakaran et al., 2006). L'analogue 2-méthoxyphényle du MPT, appelé [¹¹C]MMP ou [¹¹C]CUMI-101, semble être le radiotracer donnant les résultats les plus intéressants. En effet, le rendement de synthèse est plus important par rapport aux analogues précédents et son affinité, sa sélectivité et sa fraction libre mesurable en font un bon radiotracer pour l'imagerie TEP chez l'homme (Milak et al., 2008). De plus, les études récentes ont montré qu'il était sensible aux changements de concentration de sérotonine dans des conditions physiologiques (Milak et al., 2010). Cependant, les désavantages relatifs à ce radiotracer sont de deux ordres : (i) il n'a pas encore été démontré que le [¹¹C]MMP, de structure chimique proche de celle du S14506, ne se fixe pas également sur les 5-HT_{1A} de basse affinité; (ii) le radiomarquage au carbone 11 (de courte demi-vie radioactive) limite la diffusion de ce radiotracer à proximité de centres équipés d'un cyclotron.

Ainsi, l'analyse de la littérature nous montre qu'il y a encore nécessité de développer un agoniste 5-HT_{1A} fluoré pour l'imagerie TEP. Un radiotraceur agoniste permettrait des études encore inédites :

- 1) Pouvoir déterminer *in vivo* le ratio [récepteur à haute affinité/ récepteur à basse affinité] dans le cerveau humain en comparant l'imagerie de l'agoniste à l'imagerie d'un antagoniste;
- 2) Permettre une mesure indirecte des neurotransmetteurs cérébraux de manière non invasive (la 5-HT dans notre cas);
- 3) Mesurer la désensibilisation ou la sensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G au cours de processus physiologiques, pathologiques ou thérapeutiques.

Dans ce contexte, la publication d'une nouvelle série d'agonistes 5-HT_{1A} à visée antidépressive a attiré notre attention. Cette publication du Centre de recherche Pierre Fabre avait pour point de départ le pharmacophore du F13640, molécule en cours d'essais cliniques pour le traitement de douleurs chroniques neuropathiques (Deseure et al., 2007). Les pharmaco-chimistes du laboratoire ont synthétisé une série de molécules agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (Maurel et al., 2007). Le F15599 semble être la molécule la plus intéressante avec un K_d de 2,24nM pour le récepteur 5-HT_{1A} et une très bonne spécificité (testé sur plusieurs récepteurs, enzymes, transporteurs...) (Maurel et al., 2007). Des essais *in vivo* chez le rat montrent une activité d'agoniste. Dans le test de nage forcée, le F15599 démontre aussi des propriétés de type antidépresseur, bloquées par un prétraitement au WAY100635, antagoniste spécifique des récepteurs 5-HT_{1A} (Maurel et al., 2007). Diverses études neuropharmacologiques *in vitro* et *in vivo* ont été menées sur le F15599, dans le but d'étayer ses propriétés précliniques d'antidépresseur et d'affiner son mécanisme d'action moléculaire. Ainsi, le F15599 interagit de manière préférentielle avec les protéines G de sous-type G_{ai} plutôt que G_{ao} (Newman-Tancredi et al., 2009). Il a aussi été démontré que le F15599 augmente la fixation du ³⁵S-GTPgamma sur la membrane du cortex frontal. Le même phénomène a lieu dans le noyau du raphé dorsal mais avec des concentrations plus fortes (Newman-Tancredi et al., 2009). De la même manière, le F15599 active l'induction de cFos dans le cortex préfrontal, un peu moins dans le noyau du raphé dorsal et

pas dans le noyau du raphé médian (Newman-Tancredi et al., 2009). Des études complémentaires d'électrophysiologie montrent que le F15599 augmente la décharge dans les neurones pyramidaux du cortex préfrontal médian et réduit celle du noyau du raphé dorsal. Ces deux effets sont bloqués par le WAY100635, validant ainsi l'implication du récepteur 5-HT_{1A} (Llado-Pelfort et al., 2010). Cette activation préférentielle des récepteurs postsynaptique 5-HT_{1A} pourrait être favorable dans des pathologies accompagnées de déficits de mémoire et de cognition comme la schizophrénie et la dépression (Newman-Tancredi, 2010 pour revue). Cette piste repose notamment sur l'atténuation par le F15599 de déficits cognitifs induit par la phencyclidine dans des tâches d'apprentissage (Depoortère et al., 2009).

Cependant, au-delà de ces propriétés neuropharmacologiques inédites, les principales caractéristiques du F15599 qui nous ont convaincues pour son utilisation en imagerie ont été :

- (i) son caractère agoniste pur;
- (ii) son affinité pour le récepteur 5-HT_{1A} proche du nM;
- (iii) son excellente spécificité (testée sur une centaine de cibles);
- (iv) sa structure chimique incluant un atome de fluor facilement substituable par un fluor 18 et ne modifiant pas ses caractéristiques pharmacologiques après radiomarquage.

Après accord de collaboration, les pharmaco-chimistes du laboratoire Pierre Fabre (Castres) ont synthétisé le précurseur nitré du F15599. Les premières études ont consisté à faire des compétitions avec le [¹⁸F]MPPF, un traceur antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} synthétisé de manière régulière au Cermep. Les résultats obtenus en *in vitro* nous ont permis de voir une disparition du marquage au [¹⁸F]MPPF par le F15599 froid à partir de 10nM dans le noyau du raphé dorsal et l'hippocampe chez le rat. Les expériences *ex vivo* réalisées chez le rat avec préinjection de 0,5mg/kg de F15599 froid montre une diminution du marquage du [¹⁸F]MPPF de 60%. Ces résultats démontrent que le F15599 cible une partie des récepteurs en commun avec le [¹⁸F]MPPF.

Le radiomarquage du F15599 réalisé au CERMEP, nous a permis d'obtenir une pureté radiochimique de 98% et une activité spécifique satisfaisante. La lipophilie que nous avons obtenue *in vitro* est compatible avec un bon passage de la BHE même si ce paramètre n'est pas toujours prédictif d'un bon passage *in vivo* (Laruelle et al., 2003). Les premières expériences avec le radiotraceur fluoré montrent un bon passage de la barrière hémato-encéphalique, autant chez le rat que chez le chat. Un marquage assez important a été noté dans une structure que nous avons identifiée, après repérage sur des atlas anatomiques de cerveau de chat, comme étant l'éminence médiane. Celle-ci fait partie des organes circum-ventriculaires qui ne possèdent pas de barrière hémato-encéphalique et qui sont pourvus d'une vascularisation riche (capillaires fenêtrés) permettant un échange facilité entre le sang et le LCR (Gross, 1992).

L'étude des métabolites radioactifs nous montre que 95 % de la radioactivité cérébrale est due au radiotraceur inchangé entre 10 et 40 min après l'injection. Nous pouvons donc exclure un marquage non spécifique lié à un métabolite radioactif passant la BHE. Ce résultat aura toute son importance lors des études ultérieures de modélisation en vue de la quantification de la fixation du radiotraceur (cf Perspectives).

Les premières autoradiographies *in vitro* chez le rat et le chat, montrent un marquage des structures riches en 5-HT_{1A} comme le cortex cingulaire, l'hippocampe ou encore le noyau du raphé dorsal. Ces localisations sont en accord avec la distribution connue des récepteurs 5-HT_{1A} (Lanfumeu and Hamon, 2004). Les expériences de compétitions *in vitro* réalisées chez le rat confirment cette composante 5-HT_{1A}. En effet, on observe une diminution du marquage du [¹⁸F]F15599 dans l'hippocampe après addition de WAY100635, ou de 8-OHDPAT démontrant que la majorité de la fixation du [¹⁸F]F15599 se fait de manière réversible sur les récepteurs 5-HT_{1A}.

Il est cependant à noter que les études de marquage *in vivo* et *ex vivo* chez le rat et le chat montrent un pattern de fixation différent de celui trouvé *in vitro*. En effet, on peut voir dans les expériences *in vivo* et *ex vivo* un marquage plus important dans le cortex cingulaire comparé à l'hippocampe. Ceci est à priori surprenant car la densité des récepteurs 5-HT_{1A} est supérieure dans l'hippocampe

que dans le cortex (Lanfumeey and Hamon, 2004). Aucun radiotracer (antagoniste) des récepteurs 5-HT_{1A} n'avait montré de telle différence. Cependant, au vu de la très grande sélectivité du F15599 (et donc du [¹⁸F]F15599) vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{1A}, plus de 1000 fois supérieures par rapport à tous les autres récepteurs (Maurel et al., 2007), son interaction avec un autre récepteur est peu probable. De plus, les co-incubations que nous avons effectuées avec le WAY100635 et le 8-OHDPAT montrent une inhibition de la fixation du [¹⁸F]F15599 et confirment que la fixation de notre radiotracer se fait sur les récepteurs 5-HT_{1A}. Dans les études de compétition *ex vivo*, on peut voir que la préinjection et la postinjection de WAY100635 bloquent la fixation du [¹⁸F]F15599 dans le cortex cingulaire mais ne changent rien dans le cervelet, région pauvre en récepteurs 5-HT_{1A}. Ces résultats montrent une spécificité du marquage dans le cortex cérébral. Le profil de fixation assez particulier du [¹⁸F]F15599 peut être expliqué par les différences de couplage régionale pour les protéines G (Mannoury La cour et al., 2006). En d'autres termes, on peut supposer que le [¹⁸F]F15599 injecté *in vivo* se fixe seulement sur une population spécifique de récepteurs couplés à certaines protéines G et permettrait donc une imagerie des récepteurs spécifique en fonction de la région. La comparaison *in vitro* entre le [¹⁸F]MPPF et le [¹⁸F]F15599 montre que la majorité des régions 5-HT_{1A} sont marquées, avec une densité de marquage moins élevée avec le [¹⁸F]F15599 qu'avec le [¹⁸F]MPPF, particulièrement pour l'hippocampe. Le marquage avec le [¹⁸F]F15599 y est bien moins intense que le marquage avec le [¹⁸F]MPPF, bien que l'affinité du [¹⁸F]F15599 pour les récepteurs 5-HT_{1A} soit très proche de celle du [¹⁸F]MPPF (2,24nM et 3,3 nM, respectivement Maurel et al., 2007 ; Zhuang et al., 1994) et bien que nos conditions expérimentales soient rigoureusement les mêmes pour les deux radiotraceurs (en terme de composition de tampon, de température, d'activité spécifique, de film autoradiographique, de manipulateur, ...). Cette différence de fixation peut être due à l'état des récepteurs reconnus par le [¹⁸F]F15599 sachant que le potentiel de liaison d'un agoniste est moins important que celui d'un antagoniste. Les études *in vitro* que nous avons faites avec le Gpp(NH)p montrent que la liaison du [¹⁸F]F15599 est diminuée. En effet, le Gpp(NH)p, analogue structural non hydrolysable de GTP, permet de découpler les récepteurs couplés aux protéines G et de rendre les récepteurs sous leur conformation inactive. Cette expérience nous montre donc

que le [^{18}F]F15599 à la concentration employée se fixe seulement sur une population de récepteurs couplés aux protéine G, les récepteurs à haute affinité (Gozlan et al., 1988). Les mêmes études réalisées avec le Gpp(NH)p et le [^{18}F]MPPF montrent, quant à elles, une augmentation de la fixation. En effet, le découplage produit par le Gpp(NH)p permet aussi à la sérotonine endogène d'être libérée et donc augmente le nombre de sites de fixation disponibles pour le [^{18}F]MPPF (Assié et al., 1999). Il est connu que les récepteurs 5-HT_{1A} sont couplés à différentes protéines G selon leur localisation. Ainsi, les récepteurs 5-HT_{1A} sont couplés aux G α 0 dans le cortex cérébral et sont couplés aux G α i3 dans le noyau du raphé dorsal (Mannoury la cour et al., 2006). Ceci suggère qu'*in vivo*, la fixation du [^{18}F]F15599 est accentuée sur les G α i3, en accord avec les données *in vitro* obtenues précédemment (Newman-Tancredi et al., 2009).

On sait que la liaison spécifique d'un traceur radioactif (ou « Binding Potential ») est fonction de la densité du site de liaison visé (B_{max}) et de son affinité pour le site (K_d): BP = B_{max}/K_d. La plupart des radiotraceurs TEP du système nerveux central ont un ratio B_{max}/K_d supérieur à dix (Patel et al., 2008). Sachant que les récepteurs 5-HT_{1A} ont un B_{max} de 6nM dans l'hippocampe du rat, il est donc souhaitable d'avoir un ligand avec une affinité inférieure à 1 nM pour s'approcher de ce ratio. Ainsi, l'agoniste TEP synthétisé par l'équipe de Parsey à Columbia marqué au carbone 11, le [^{11}C]CUMI-101 avait une affinité inférieure à 0,5nM, ce qui était plus favorable à l'analogue précédent, le [^{11}C]MPT, qui avait une affinité de 1,4nM pour les récepteurs 5-HT_{1A} (Kumar et al., 2006; Kumar et al., 2007). Dans ce contexte, l'affinité du F15599 (2,24nM) peut être considérée comme insuffisante avec un ratio B_{max}/K_d <5 et est défavorable à une fixation spécifique suffisante pour l'imagerie *in vivo*.

Dans une seconde étape de notre projet, nous nous sommes donc intéressés à un analogue chimique du F15599, également synthétisé et caractérisé par le groupe de Pierre Fabre (Vacher et al., 1999). Le F13714 est tout aussi spécifique pour les récepteurs 5-HT_{1A} mais a une affinité très élevée pour ce récepteur: 0,01-0,05 nM (Newman-Tancredi et al., 2009), soit près d'une centaine de fois supérieure au F15599.

Malgré la similitude de structure chimique entre le F15599 et le F13714 (seul un groupement -NH-CH₃ supplémentaire distingue le F13714 du F15599) et le caractère agoniste 5-HT_{1A} commun entre les deux molécules, il y a des différences neuropharmacologiques notables. En effet, chaque agoniste active des sous-populations distinctes de protéines G. S'il est décrit que la 5-HT active les protéines Gα1 et les protéines Gαo avec la même intensité, le F15599 stimule davantage les protéines Gα1 que les protéines Gαo, alors que le F13714 a un profil de stimulation intermédiaire (Newman-Tancredi et al., 2009). Le corolaire de ses spécificités de profils de stimulation de protéines G est que chaque agoniste (par l'intermédiaire du récepteur 5-HT_{1A}) aura un effet davantage ciblé sur une région cérébrale. En effet, le couplage des récepteurs 5-HT_{1A} avec les protéines G est très région-dépendant, avec un couplage préférentiel 5-HT_{1A}/Gαo dans l'hippocampe et un couplage préférentiel 5-HT_{1A}/Gαi dans le raphé (Mannoury la Cour et al., 2006). Ainsi, le F15599 aura un effet plus « post-synaptique » au niveau cortical (avec des effets neuropsychopharmacologiques antidépresseurs potentiels) alors que le F13714 aura un effet plus présynaptique dans les noyaux du raphé. Il est cependant à noter que les caractéristiques *in vitro* ne sont pas systématiquement transposables *in vivo* (Newman-Tancredi et al., 2009).

Dans notre cas, il est à noter que la caractéristique principale du F13714 est son affinité pour les 5-HT_{1A} particulièrement élevée, favorable a priori à une imagerie des sites agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (moins nombreux que les sites accessibles aux antagonistes) et devant produire un meilleur ratio signal/bruit que le F15599 radiomarqué.

Tout comme le F15599, le F13714 possède une structure permettant son radiomarquage au fluor 18. Ces différents arguments nous ont donc décidé à mettre au point le radiomarquage du précurseur chimique du F13714 fournis par notre partenaire industriel.

Notre démarche méthodologique a été identique à celle utilisée pour le F15599. Les expériences avec le [¹⁸F]MPPF montrent que le F13714 est capable de déplacer le [¹⁸F]MPPF à des concentrations plus faibles que celle utilisées pour le F15599. En effet, on peut déjà voir une diminution de la fixation du [¹⁸F]MPPF avec 0,1nM de F13714 alors que le F15599 ne fait effet qu'à partir de 10nM. Dans les expériences

ex vivo, une préinjection de 0,125mg/kg de F13714 provoque une diminution de la fixation du [^{18}F]MPPF de 80% dans le cortex cingulaire et de 50 % dans l'hippocampe et le NRD, alors qu'un tel effet n'était pas mesuré avec la préinjection de concentration identique de F15599. Ces différentes études confirment *in vivo* l'affinité supérieure pour les 5-HT_{1A} du F13714 par rapport au F15599 (comparées dans les mêmes conditions expérimentales).

Le radiomarquage du F13714 nous a permis d'obtenir une pureté radiochimique supérieure à 98% avec une très bonne activité spécifique. La lipophilie du F13714 présage un bon passage de la barrière hémato encéphalique (Laruelle et al., 2003). La distribution *in vitro* du [^{18}F]F13714 est en accord avec la distribution des récepteurs 5-HT_{1A} (Lanfumeu and Hamon, 2004) et les compétitions réalisées avec le WAY100635 à 1 μM montrent une diminution très nette du marquage du [^{18}F]F13714.

Les images *in vivo* chez le chat révèlent un marquage intense du cortex cérébral, ainsi que de l'amygdale et de l'hippocampe, régions riches en récepteurs 5-HT_{1A}. Les expériences *in vitro* chez le chat montrent un marquage du [^{18}F]F13714 très intense de l'hippocampe. En effet, le ratio [hippocampe/cervelet] est de 4,5 pour le [^{18}F]F13714. Cette intensité de marquage des récepteurs 5-HT_{1A} est nettement plus élevée que pour le [^{18}F]F15599, confirmant ainsi le caractère crucial de l'affinité du radiotraceur pour le récepteur. Il est à noter que le marquage du [^{18}F]F13714 est plus marqué dans l'aire CA1 de l'hippocampe du chat, tout comme le marquage du [^3H]8-OHDPAT rapporté précédemment par une équipe des Hôpitaux Universitaires de Genève (Charnay et al., 1997). Par contre, le marquage semble moins intense dans le cortex parahippocampique pour le [^{18}F]F13714 par rapport au [^3H]8-OHDPAT.

L'ajout de Gpp(NH)p entraîne une diminution de la fixation de [^{18}F]F13714 (-60%), confirmant le caractère agoniste de la molécule. Il est à noter que la diminution du marquage était plus importante pour le [^{18}F]F15599 dans les mêmes conditions (-80%). Les études de compétition *in vivo* chez le chat avec le WAY100635 nous permettent de voir une diminution de la fixation dans le cortex cingulaire et l'amygdale. En effet, les ratios obtenus nous permettent de voir que la fixation dans le cervelet n'est pas beaucoup diminuée que ce soit lors de la préinjection ou

de la postinjection du WAY100635. Par contre, les ratios pour les différentes régions d'intérêts sur le cervelet sont tous plus faibles et permettent de voir une diminution de la liaison dans les régions riches en 5-HT_{1A}. Enfin, le F13714 apparaît être un substrat de la glycoprotéine P. En effet, la préinjection de ciclosporine au rat nous permet d'avoir une augmentation de la fixation dans le cortex cingulaire et l'hippocampe ce qui suppose une augmentation du passage de la BHE.

En conclusion de ces travaux, il apparaît que le [¹⁸F]F13714 est un radiotraceur présentant des caractéristiques plus favorables à son usage en TEP que le [¹⁸F]F15599. Il est donc envisagé de poursuivre son développement pour le transformer à terme en radiopharmaceutique utilisable chez l'homme. Ceci nécessite un certain nombre de travaux à planifier à l'avenir.

Les perspectives de travaux incluront la quantification et la modélisation de la fixation cérébrale de l'agoniste par rapport à l'antagoniste de référence, le [¹⁸F]MPPF. Ceci implique notamment l'accès à des cinétiques sanguines artérielles (pour la voie d'entrée) et au dosage des métabolites sanguins.

Il sera également pertinent de tester la sensibilité de l'agoniste radiomarké aux fluctuations de sérotonine (sur la base du modèle de rat avec injection de fenfluramine et microTEP). En effet, même si de nombreux échecs sont rapportés dans la littérature pour les radiotraceurs 5-HT_{1A} ([Patterson et al., 2010](#)), il est probable que cette sensibilité ne soit pas commune à l'ensemble des agonistes 5-HT_{1A}.

Enfin il sera intéressant d'établir la cartographie de la répartition des récepteurs 5-HT_{1A} couplés/découplés (F13714 vs MPPF) chez le rat et le chat.

Lorsque l'ensemble de ces étapes sera franchi, il pourra être envisagé un transfert du [¹⁸F]F13714 comme radiopharmaceutique chez l'homme.

Partie 2 : APPORTS DE RADIOTRACEURS TEP POUR L'IMAGERIE DES RECEPTEURS 5-HT₇

Les récepteurs 5-HT₇ sont les derniers récepteurs de la sérotonine à avoir été découverts (Bard et al., 1993 ; Plassat et al., 1993 ; Lovenberg et al., 1993 ; Shen et al., 1993 ; Ruat et al., 1993 ; Meyerhof et al., 1993). Nous avons décrit précédemment (chapitre II,6, partie bibliographique) que ces récepteurs sont probablement impliqués dans plusieurs pathologies du système nerveux central (Hedlund, 2009 pour revue). D'autre part, il est proposé que les antagonistes 5-HT₇ pourraient constituer une piste thérapeutique antidépressive (Mullins et al., 1999 ; Guscott et al., 2005). Cependant, seule une recherche translationnelle permettrait de tester chez l'homme ces pistes thérapeutiques et de démontrer les implications de cette famille de récepteur. Ceci passe notamment par des travaux d'imagerie *in vivo*, tant chez des modèles animaux que chez l'homme sain puis, à terme, chez le patient.

À l'heure actuelle, aucun radiotracer TEP n'est validé pour les récepteurs 5-HT₇. L'enjeu de trouver le premier radiotracer de ce récepteur permettant une imagerie moléculaire et fonctionnelle est donc important.

Notre démarche a été différente de celle employée précédemment pour l'agoniste 5-HT_{1A} dans la mesure où nous avons été impliqués dans le design et le choix des molécules candidates. À ce stade, deux stratégies complémentaires ont été envisagées : (i) construire une molécule « idéale » à partir du ou des pharmacophores de ligands 5-HT₇ existants et (ii) partir de la structure de ligands spécifiques de récepteur 5-HT₇ actuellement utilisés dans les études de neuropharmacologie.

L'une des molécules les plus utilisées pour étudier les récepteurs 5-HT₇ est un agoniste inverse (longtemps considéré comme un antagoniste pur) nommé le SB269970 (Mahé et al., 2004). Les quelques rares études *in vitro* de localisation des récepteurs 5-HT₇ ont été faites par autoradiographie avec ce ligand radiomarké au tritium, le [³H]SB269970 (Varnäs et al., 2004). Les études pour les récepteurs 5-HT₇ se font sur la base de deux pharmacophores (Bojarski, 2006). Le premier

pharmacophore qui a été utilisé pour synthétiser des molécules antagonistes des récepteurs 5-HT₇ a été décrit par l'équipe de Lavandera à Madrid (Figure 76) (Lopez-Rodriguez et al., 2000, 2003).

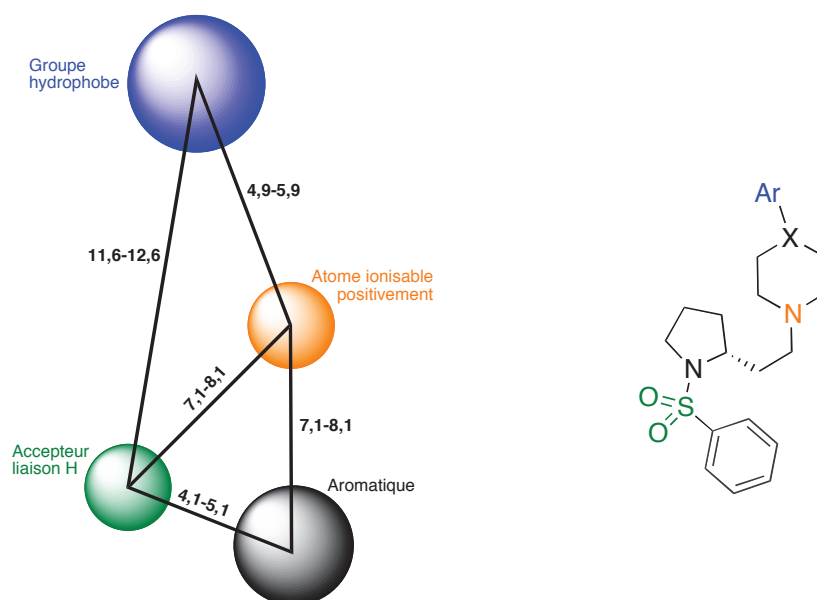


Figure 76: Premier pharmacophore proposé pour des ligands ciblant les récepteurs 5-HT₇ (d'après Bojarski, 2006).

Le deuxième pharmacophore a été basé sur la structure du SB269970 (Bojarski, 2006). C'est celui-ci que les chimistes de l'UMR 5246 ont décidé d'utiliser pour synthétiser différentes molécules antagonistes des récepteurs 5-HT₇ (Figure 76).

L'équipe des chimistes qui collaborent avec nous (UMR5246) avait déjà réalisé le marquage au fluor 18 d'une molécule basée sur le premier pharmacophore (Andriès et al., 2010). Les évaluations radiopharmacologiques auxquelles nous avons participé n'avaient pas été concluantes en termes d'imagerie et nous avons abandonné cette piste structurale (Andriès et al., 2010).

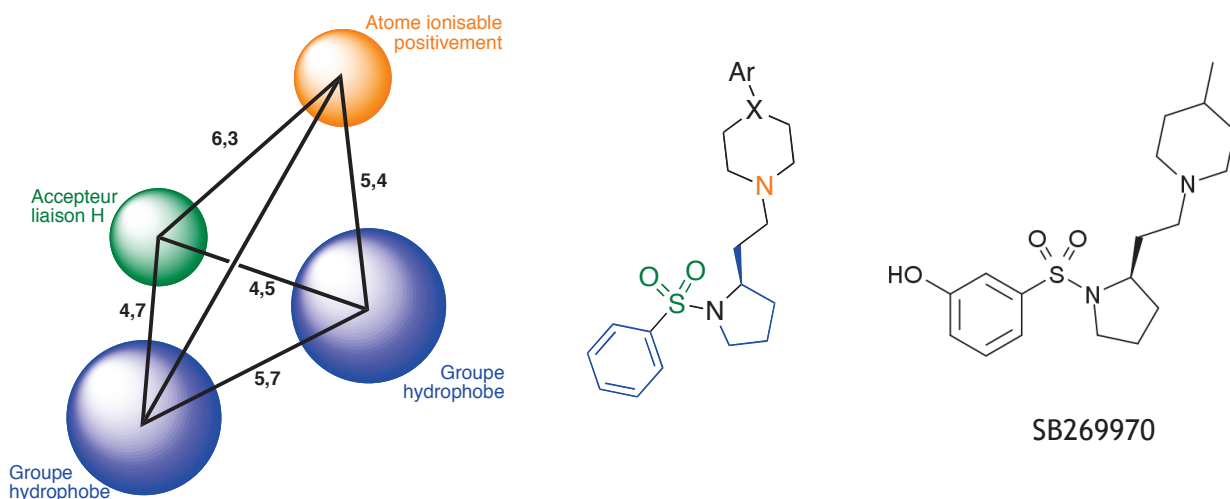


Figure 77 : Pharmacophore des ligands ciblant les récepteurs 5-HT₇ (d'après Bojarski, 2006) et utilisé pour le design de nos radioligands. A droite, structure chimique du SB269970.

La nouvelle série de radioligands pour les 5-HT₇ utilisée dans cette étude est basée sur la structure du SB269970 (Figure 77). Deux familles ont été synthétisées : la famille FP3 et la famille FPMP. La première famille est caractérisée chimiquement par la présence d'un hétérocycle de type méthylpiperidine. Dans la seconde famille, cet hétérocycle est remplacé par une arylpiperazine. Deux positions ont été retenues pour le marquage au fluor 18 par substitution nucléophile: la position en para sur le noyau phényle (4FP3 et 4FPMP) et la position en ortho (2FP3 et 2FPMP). Il est à noter que la position en méta n'est pas réalisable radiochimiquement et n'a donc pas été envisagée.

Nous avons donc obtenu quatre radiotraceurs distincts (le [¹⁸F]4FP3, le [¹⁸F]2FP3, le [¹⁸F]4FPMP et le [¹⁸F]2FPMP) que nous avons évalués radiopharmacologiquement dans le but de sélectionner la meilleure molécule pour son développement comme radiopharmaceutique des récepteurs 5-HT₇.

Les radiosynthèses ont permis d'obtenir quatre molécules marquées au fluor 18 avec une pureté radiochimique et une activité spécifique satisfaisantes et compatibles avec les conditions de dose traceuse en TEP.

Le calcul de la lipophilie des quatre radiotraceurs montre que la série des FP3 a une lipophilie compatible avec un bon passage de la barrière hémato encéphalique.

La famille FPMP, quant à elle, a une lipophilie médiane présageant d'un passage trop élevé et donc de la possibilité d'un marquage non spécifique. Cependant, même si ce facteur est important, il n'est pas systématiquement décisif dans le choix d'un radiotraceur (Watherhouse et al., 2003). Bien que les récepteurs 5-HT₇ aient peu d'homologie avec les autres récepteurs à la sérotonine (Plassat et al., 1993 ; Shen et al., 1993 ; Tsou AP et al., 1994), nous avons décidé de faire tester par un organisme extérieur, l'affinité de nos quatre molécules pour les récepteurs 5-HT_{1A}. En effet, les études précédentes ont montré que beaucoup de ligands à affinité 5-HT₇ étaient aussi affins pour les 5-HT_{1A} (Medina et al., 2009). L'évaluation *in vitro* (réalisée par la CEREP, www.cerep.fr) indique que la série FPMP a une composante agoniste pour les récepteurs 5-HT_{1A} avec une EC₅₀>10⁻⁵. La série des FP3 n'a pas d'affinité pour les récepteurs 5-HT_{1A}. L'affinité vis-à-vis des récepteurs 5-HT₇ a aussi été réalisée par la CEREP. Les quatre molécules présentent une bonne affinité pour les récepteurs 5-HT₇ en particulier le 2FPMP avec un pK_B (constante de dissociation) de 2nM. De telles valeurs situées entre 1nM et 10nM sont importantes en raison de la faible densité des récepteurs 5-HT₇ observé dans de nombreuses espèces (Thomas et al., 2002).

Les études *in vitro* indiquent que les quatre radiotraceurs se fixent sur les régions connues pour être riches en récepteurs 5-HT₇, comme le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe et le cortex cérébral (Varnäs et al., 2004). Cependant, il est à noter que la distribution des radiotraceurs de la famille FPMP a montré une densité plus marquée dans l'hippocampe. Cette structure est décrite dans la littérature comme contenant des récepteurs 5-HT₇ mais avec une densité moins intense que pour le thalamus par exemple (Varnäs et al., 2004). Il n'est pas exclu que la composante 5-HT_{1A} de la famille 2FPMP révélée par les évaluations pharmacologiques initiales soit en cause.

Les études de compétition *in vitro* confirment le marquage spécifique de la série FP3 sur les récepteurs 5-HT₇. En effet, l'ajout de concentrations croissantes de SB269970, antagoniste spécifique des 5-HT₇, déplace de manière dose-dépendante la fixation de nos radiotraceurs. Cela n'est pas le cas pour la famille FPMP où l'on n'observe aucune modification de la fixation du [¹⁸F]4FPMP ou encore du [¹⁸F]2FPMP, malgré l'ajout de concentrations croissantes de SB269970. Si les études

de compétition *ex vivo* avec le SB269970 montraient une diminution du marquage pour les quatre radiotraceurs, elles ont été réalisées à des concentrations élevées d'antagoniste, difficilement comparables aux conditions utilisées *in vitro*.

Les expériences *ex vivo* et *in vivo* montrent un passage de la BHE des quatre molécules, malgré une contribution importante de la glycoprotéine P (bloquée par la pré-injection de ciclosporine). La fixation se retrouve dans le cortex cingulaire, le thalamus et le cervelet, en accord avec la distribution cérébrale des récepteurs 5-HT₇.

Les expériences de compétition *in vivo* chez le chat avec préinjection de SB269970 par voie intra-péritonéale n'ont montré aucune diminution de la fixation des quatre radiotraceurs, contrairement aux résultats obtenus en *ex vivo* par microTEP chez le rat. Il est probable que cette absence de modification de la fixation des radiotraceurs soit attribuable aux quantités injectées insuffisantes de SB269970 et/ou au délai de pré-injection insuffisant. Il est à noter qu'il n'y a pas d'antécédent dans la littérature nous ayant permis d'ajuster ces paramètres expérimentaux.

Cependant, au vu des caractéristiques pharmacologiques *in vitro* chez le rat et des résultats de compétition *in vitro* avec le SB269970 chez le rat, nous avons décidé de nous focaliser sur la famille des FP3.

Nous avons redémarré une série d'études d'imagerie TEP chez le chat, en effectuant la préinjection de SB269970 par voie intraveineuse, afin d'avoir une cinétique d'accès cérébral plus rapide. Si l'injection intraveineuse du SB269970 n'a aucun effet sur le marquage du [¹⁸F]4FP3, elle a diminué de près de cinq fois le niveau de fixation du [¹⁸F]2FP3. Ce dernier résultat confirme que le [¹⁸F]2FP3 présente les meilleures propriétés radiopharmacologiques parmi les quatre radiotraceurs que nous avons développés.

Pour clore nos études, nous avons vérifié que l'image cérébrale du [¹⁸F]2FP3 était bien due au radiotraceur inchangé. En effet, la recherche des métabolites cérébraux effectués montre que plus de 95% de la radioactivité présente dans le cerveau du rat est due au [¹⁸F]2FP3, excluant la contribution d'un métabolite radioactif suffisamment lipophile pour atteindre le cerveau.

En conclusion, il s'agit de la première étude montrant des résultats satisfaisants en imagerie *in vivo* pour les récepteurs 5-HT₇. Bien que les quatre radiotraceurs montrent des caractéristiques satisfaisantes pour l'étude des récepteurs 5-HT₇ *in vitro*, les expériences *in vivo* chez le rat et le chat nous ont permis de voir que la série FP3, et plus particulièrement le [¹⁸F]2FP3, présente un marquage spécifique et réversible des récepteurs 5-HT₇. Ainsi, le [¹⁸F]2FP3 semble être le premier radiotraceur TEP 5-HT₇ développé avec succès. Cependant, des études supplémentaires sont encore nécessaires avant d'envisager son utilisation potentielle en imagerie humaine.

Perspectives d'études :

Ces travaux sont exploratoires et ne peuvent être considérés comme initiateurs d'un nouvel axe de recherche. Les derniers résultats obtenus chez le chat avec le [¹⁸F]2FP3 nous incitent à poursuivre l'évaluation du radiotraceur en faisant des expériences supplémentaires de compétition.

Le récepteur 5-HT₇ ayant une haute homologie interspèce (95% entre l'homme et le rat ; [Martin-Cora et al., 2004](#)), l'utilisation à plus long terme de ce radioligand chez l'humain est envisageable. Cependant, des études de quantification avec modélisation doivent venir compléter ce travail pour pouvoir transposer ces résultats à l'homme.

En parallèle, nos résultats ont encouragé les chimistes de l'UMR5246 à synthétiser une nouvelle série de molécules 5-HT₇. Comme nous l'avons déjà montré, les ligands des récepteurs 5-HT₇ ont souvent des composantes 5-HT_{1A}. L'intérêt de cette nouvelle série est donc d'augmenter la spécificité envers les 5-HT₇. Une étude de l'équipe de Guillaumet à Orléans ([Badarau et al., 2009](#)) a attiré notre attention en montrant que l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée entre les deux hétérocycles augmente la sélectivité 5-HT₇ versus 5-HT_{1A} (Figure 78 A). Une nouvelle série de molécule a donc été synthétisée avec l'ajout d'un carbone en prenant comme base de départ les deux familles utilisées dans cette thèse, les FP3 et les FPMP.

Une autre série de molécules a également été synthétisée sur le modèle de l'équipe de Simig de Budapest ([Volk et al., 2008](#)). En effet, dans cette étude, les

auteurs avaient démontré que l'ajout d'un atome de chlore sur l'aromatique de la pipérazine augmentait la sélectivité de la molécule envers les récepteurs 5-HT₇ versus 5-HT_{1A}. De nouvelles molécules ont donc été synthétisées en combinant les deux conditions citées c'est-à-dire avec l'ajout d'un carbone entre les deux hétérocycles et avec l'ajout d'un atome de chlore sur la base des deux familles FP3 et FPMP (Figure 78B).

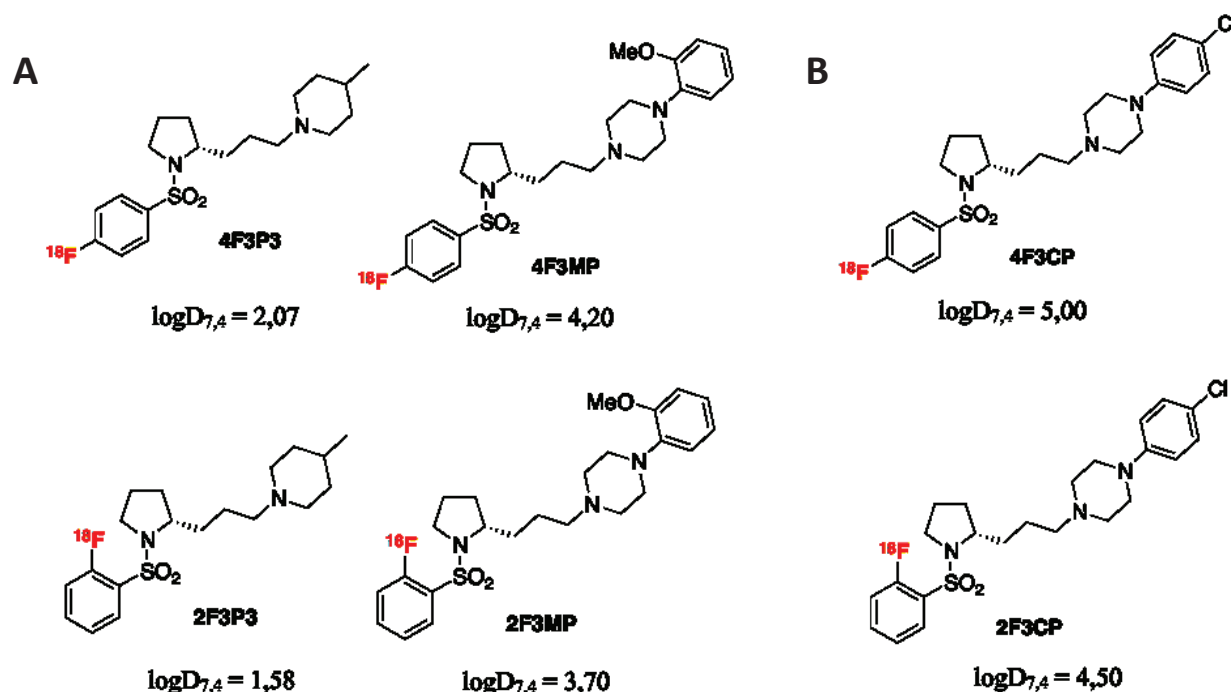


Figure 78 : A. Nouvelle série de radioligands 5-HT₇ avec l'ajout d'un carbone entre les deux hétérocycles. B. Nouvelle série de radioligands 5-HT₇ avec l'ajout d'un carbone entre les deux hétérocycles et d'un chlore sur l'aromatique de la pipérazine (la lipophilie calculée est indiquée par le logD à pH 7,4).

Bibliographie

1. Abbas AI, Hedlund PB, Huang XP, Tran TB, Meltzer HY, Roth BL.(2009) Amisulpride is a potent 5-HT₇ antagonist: relevance for antidepressant actions *in vivo*. *Psychopharmacology* (Berl). 205(1):119-28.
2. Adell A, Artigas F, (1991). Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An *in vivo* brain microdialysis study. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 343(3), 237-244.
3. Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O.(1990) Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *J Biol Chem*.265(10):5825-32.
4. Albert PR, Le François B (2010) Modifying 5-HT_{1A} Receptor Gene Expression as a New Target for Antidepressant Therapy. *Front Neurosci*. 4: 35.
5. Andriès J, Lemoine L, Mouchel-Blaisot A, Tang S, Verdurand M, Le Bars D, Zimmer L, Billard T. (2010) Looking for a 5-HT₇ radiotracer for positron emission tomography. *Bioorg Med Chem Lett*. 20(12):3730-3.
6. Arai H, Kosaka K, Iizuka R.(1984) Changes of biogenic amines and their metabolites in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. *J Neurochem*. 43(2):388-93.
7. Arvidsson LE, Hacksell U, Nilsson JL, Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wikstrom H.(1981) 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *J Med Chem*. 24(8):921-3.
8. Assié MB, Cosi C, Koek W. (1999) Correlation between low/high affinity ratios for 5-HT_{1A} receptors and intrinsic activity. *Eur J Pharmacol*. 386(1):97-103.
9. Avissar S, Schreiber G, Danon A, Belmaker RH. (1988) Lithium inhibits adrenergic and cholinergic increases in GTP binding in rat cortex. *Nature*. 331(6155):440-2.
10. Avissar S, Schreiber G.(2002) Toward molecular diagnostics of mood disorders in psychiatry. *Trends Mol Med*. 8(6):294-300.
11. Avissar S, Schreiber G. (2006) The involvement of G proteins and regulators of receptor-G protein coupling in the pathophysiology, diagnosis and treatment of mood disorders. *Clin Chim Acta*. 366(1-2):37-47.
12. Azmitia EC, Gannon PJ.(1986) The primate serotonergic system: a review of human and animal studies and a report on *Macaca fascicularis*. *Adv Neurol*.43:407-68.
13. Aznavour N, Zimmer L.(2007) [¹⁸F]MPPF as a tool for the *in vivo* imaging of 5-HT_{1A} receptors in animal and human brain. *Neuropharmacology*. 52(3):695-707.
14. Badarau E, Suzenet F, Bojarski AJ, Fînaru AL, Guillaumet G. (2009) Benzimidazolone-based serotonin 5-HT_{1A} or 5-HT_{7R} ligands: synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*. 19(6):1600-3.
15. Bagdy E, Harsing LG Jr.(1995) The role of various calcium and potassium channels in the regulation of somatodendritic serotonin release. *Neurochem Res*. 20(12):1409-15.
16. Bailey DL, Miller MP, Spinks TJ, Bloomfield PM, Livieratos L, Young HE, Jones T.(1998) Experience with fully 3D PET and implications for future high-resolution 3D tomographs. *Phys Med Biol*. 43(4):777-86.

17. Baker KG, Halliday GM, Törk I. (1990) Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol.* 301(2):147-61.
18. Bantick RA, Deakin JF, Grasby PM.(2001) The 5-HT_{1A} receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? *J Psychopharmacol.* 15(1):37-46.
19. Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL.(1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase.*J Biol Chem.* 268(31):23422-6.
20. Barnes NM, Sharp T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 38(8):1083-152.
21. Barthe N. (2007) L'imagerie bêta haute résolution. *Médecine nucléaire.* 31 (4) :193-201.
22. Belmaker RH, Agam G.(2008) Major depressive disorder.*N Engl J Med.*358(1):55-68.
23. Bender E, Pindon A, van Oers I, Zhang YB, Gommeren W, Verhasselt P, Jurzak M, Leysen J, Luyten W.(2000) Structure of the human serotonin 5-HT₄ receptor gene and cloning of a novel 5-HT₄ splice variant.*J Neurochem.* 74(2):478-89.
24. Bendotti C, Servadio A, Forloni G, Angeretti N, Samanin R.(1990) Increased tryptophan hydroxylase mRNA in raphe serotonergic neurons spared by 5,7-dihydroxytryptamine.*Brain Res Mol Brain Res.* 8(4):343-8.
25. Bertilsson L, Asberg M, Thorén P.(1974) Differential effect of chlorimipramine and nortriptyline on cerebrospinal fluid metabolites of serotonin and noradrenaline in depression. *Eur J Clin Pharmacol.* 7(5):365-8.
26. Biomarkers Definitions Working Group, (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89-95.
27. Bjarkam CR, Sørensen JC, Geneser FA.(1997) Distribution and morphology of serotonin-immunoreactive neurons in the brainstem of the New Zealand white rabbit.*J Comp Neurol.* 380(4):507-19.
28. Björklund A, Baumgarten HG, Nobin A.(1974) Chemical lesioning of central monoamine axons by means of 5,6-dihydroxytryptamine and 5,7-dihydroxytryptamine. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 10:13-33.
29. Blier P, Ward NM. (2003) Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry.* 53(3):193-203.
30. Blier P, de Montigny C. (1994) Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci.* 15(7) :220-6.
31. Bockaert J, Fozard JR, Dumuis A, Clarke DE.(1992) The 5-HT₄ receptor: a place in the sun. *Trends Pharmacol Sci.* 13(4):141-5.
32. Boehm S, Kubista H.(2002) Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev.* 54(1):43-99.
33. Bonaventure P, Kelly L, Aluisio L, Shelton J, Lord B, Galici R, Miller K, Atack J, Lovenberg TW, Dugovic C.(2007) Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT) 7 receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. *J Pharmacol Exp Ther.*321(2):690-8.

34. Borg J.(2008) Molecular imaging of the 5-HT_{1A} receptor in relation to human cognition. Behavioural Brain Research, 195(1) :103-111.
35. Bojarski AJ (2006) Pharmacophore Models for Metabotropic 5-HT Receptor Ligands Current Topics in Medicinal Chemistry 6 (18), 2005-2026
36. Borsook D, Becerra L, Hargreaves R. (2006) A role for fMRI in optimizing CNS drug development. Nat Rev Drug Discov. 5(5):411-24.
37. Bourgoin S, Soubrié P, Artaud F, Reisine TD, Glowinski J.(1981) Control of 5-HT release in the caudate nucleus and the substantia nigra of the cat. J Physiol (Paris). 77(2-3):303-7.
38. Bucht G, Adolfsson R, Gottfries CG, Roos BE, Winblad B.(1981) Distribution of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in human brain in relation to age, drug influence, agonal status and circadian variation.J Neural Transm. 51(3-4):185-203.
39. Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ.(1996) 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia.Neuropsychopharmacology. 15(5):442-55.
40. Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ.(1997) [3H]WAY-100635 for 5-HT_{1A} receptor autoradiography in human brain: a comparison with [3H]8-OH-DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia.Neurochem Int. 30(6):565-74.
41. Carli M, Bonalumi P, Samanin R.(1997) WAY 100635, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, prevents the impairment of spatial learning caused by intrahippocampal administration of scopolamine or 7-chloro-kynurenic acid.Brain Res. 774(1-2):167-74.
42. Carter D, Champney M, Hwang B, Eglen RM.(1995) Characterization of a postjunctional 5-HT receptor mediating relaxation of guinea-pig isolated ileum. Eur J Pharmacol. 280(3):243-50.
43. Chalmers DT, Watson SJ.(1991) Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain--a combined *in situ* hybridisation/*in vitro* receptor autoradiographic study. Brain Res. 561(1):51-60.
44. Chemel BR, Roth BL, Armbruster B, Watts VJ, Nichols DE.(2006) WAY-100635 is a potent dopamine D₄ receptor agonist. Psychopharmacology (Berl). 188(2):244-51.
45. Cheng KT. (2010) [O-méthyl-¹¹C]2-{4-[4-(7-Methoxynaphthalen-1-yl)piperazin-1-yl]butyl}-4-méthyl-2H-[1,2,4]triazine-3,5-dione. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD) [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2010. 2007 Jan 30 [updated 2008 Feb 26].
46. Chessick CA, Allen MH, Thase M, Batista Miralha da Cunha AB, Kapczinski FF, de Lima MS, dos Santos Souza JJ. (2006) Azapirones for generalized anxiety disorder. Cochrane Database Syst Rev. 2006 Jul 19;3:CD006115.
47. Clarke DE, Craig DA, Fozard JR.(1989) The 5-HT₄ receptor: naughty, but nice. Trends Pharmacol Sci. 10(10):385-6.
48. Cossery JM, Gozlan H, Spampinato U, Perdicakis C, Guillaumet G, Pichat L, Hamon M.(1987) The selective labelling of central 5-HT_{1A} receptor binding sites by [3H]5-methoxy-3-(di-n-propylamino)chroman. Eur J Pharmacol.140(2):143-55.

49. Cowen PJ, Anderson IM, Gartside SE.(1990)Endocrinological responses to 5-HT. *Ann N Y Acad Sci.* 600:250-7.
50. Cox DA, Cohen ML.(1996) 5-HT_{2B} receptor signaling in the rat stomach fundus: dependence on calcium influx, calcium release and protein kinase C. *Behav Brain Res.* 73(1-2):289-92.
51. Cryan JF, Markou A, Lucki I. (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci.* 23(5):238-45.
52. Cryan JF, Holmes A.(2005) The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov.* 4(9):775-90.
53. Dahlström A, Fuxe K.(1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* 20(7):398-9.
54. Daly J, Fuxe K, Jonsson G.(1974) 5,7-Dihydroxytryptamine as a tool for the morphological and functional analysis of central 5-hydroxytryptamine neurons. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 7(1):175-87.
55. de Dreuille O, Maszelin P, Foehrenbach H, Bonardel G et Gaillard JF.(2002) Principe et technique de la tomographie par émission de positons (TEP). *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Radiodiagnostic - Principes et techniques d'imagerie,* 35-310-A-10, 2002, 22 p.
56. DeKosky ST, Marek K.(2003) Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science.* 302(5646):830-4.
57. DeKosky ST.(2008) Taking the next steps in the diagnosis of Alzheimer's disease: the use of biomarkers. *CNS Spectr.* 13(3 Suppl 3):7-10.
58. Depoortère R, Auclair AL, Bardin L, Colpaert FC, Vacher B, Newman-Tancredi A. (2010) F15599, a preferential post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist: activity in models of cognition in comparison with reference 5-HT_{1A} receptor agonists. *Eur Neuropsychopharmacol.* 20(9):641-54.
59. Descarries L, Watkins KC, Garcia S, Beaudet A.(1982) The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol.* 207(3):239-54.
60. Deseure K, Bréand S, Colpaert FC.(2007) Curative-like analgesia in a neuropathic pain model: parametric analysis of the dose and the duration of treatment with a high-efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist. *Eur J Pharmacol.* 568(1-3):134-41.
61. De Vry J (1995) 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl).* 121(1):1-26.
62. Dinan TG.(1996) Serotonin: current understanding and the way forward. *Int Clin Psychopharmacol.* 11 Suppl 1:19-21.
63. Dinan TG, Scott LV.(1996) The influence of cortisol on spontaneous and 5HT stimulated prolactin release in man.*J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 7(1):45-56.
64. Dogrul A, Seyrek M. (2006) Systemic morphine produce antinociception mediated by spinal 5-HT₇, but not 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the spinal cord. *Br J Pharmacol.* 149(5):498-505.

65. Dompert WU, Glaser T, Traber J.(1985) 3H-TVX Q 7821: identification of 5-HT1 binding sites as target for a novel putative anxiolytic. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 328(4):467-70.
66. Ehlen JC, Grossman GH, Glass JD.(2001) In vivo resetting of the hamster circadian clock by 5-HT7 receptors in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 21(14):5351-7.
67. Elhwuegi AS.(2004) Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 28(3):435-51.
68. el Mestikawy S, Riad M, Laporte AM, Vergé D, Daval G, Gozlan H, Hamon M.(1990) Production of specific anti-rat 5-HT1A receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett.* 118(2):189-92.
69. Elsinga PH, Hendrikse NH, Bart J, Vaalburg W, van Waarde A.(2004) PET Studies on P-glycoprotein function in the blood-brain barrier: how it affects uptake and binding of drugs within the CNS. *Curr Pharm Des.* 10(13):1493-503.
70. Emerit MB, el Mestikawy S, Gozlan H, Rouot B, Hamon M.(1990) Physical evidence of the coupling of solubilized 5-HT1A binding sites with G regulatory proteins. *Biochem Pharmacol.* 39(1):7-18.
71. Falck B, Torp A.(1962) New evidence for the localization of noradrenalin in the adrenergic nerve terminals. *Med Exp Int J Exp Med.* 6:169-72.
72. Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ.(1988) The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT1A receptor. *Nature.* 335(6188):358-60.
73. Faure C, Mnie-Filali O, Scarna H, Debonnel G, Haddjeri N.(2006) Effects of the 5-HT7 receptor antagonist SB-269970 on rat hormonal and temperature responses to the 5-HT1A/7 receptor agonist 8-OH-DPAT. *Neurosci Lett.* 404(1-2):122-6.
74. Fernstrom JD, Hirsch MJ, Faller DV.(1976) Tryptophan concentrations in rat brain. Failure to correlate with free serum tryptophan or its ratio to the sum of other serum neutral amino acids. *Biochem J.* 160(3):589-95.
75. Filip M, Bader M.(2009) Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep.* 61(5):761-77.
76. Forbes IT, Dabbs S, Duckworth DM, Jennings AJ, King FD, Lovell PJ, Brown AM, Collin L, Hagan JJ, Middlemiss DN, Riley GJ, Thomas DR, Upton N.(1998) (R)-3,N-diméthyl-N-[1-méthyl-3-(4-méthyl-piperidin-1-yl) propyl]benzenesulfonamide: the first selective 5-HT7 receptor antagonist. *J Med Chem.* 41(5):655-7.
77. Gaddum JH, Picarelli ZP.(1957) Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol.* 120(4 Suppl):134-9
78. Gelernter J, Rao PA, Pauls DL, Hamblin MW, Sibley DR, Kidd KK. (1995) Assignment of the 5HT7 receptor gene (HTR7) to chromosome 10q and exclusion of genetic linkage with Tourette syndrome. *Genomics.* 1995 Mar 20;26(2):207-9.
79. Gerald C, Adham N, Kao HT, Olsen MA, Laz TM, Schechter LE, Bard JA, Vaysse PJ, Hartig PR, Branchek TA, et al.(1995) The 5-HT4 receptor: molecular cloning and pharmacological characterization of two splice variants. *EMBO J.* 14(12):2806-15.
80. Gershengorn MC, Osman R.(2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology.* 142(1):2-10.

81. Gershon MD, Ross LL.(1966) Location of sites of 5-hydroxytryptamine storage and metabolism by radioautography. *J Physiol.* 186(2):477-92.
82. Gether U, Kobilka BK. (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem.* 273(29):17979-82.
83. Gosseries O, Demertzi A, Noirhomme Q, Tshibanda J, Boly M, de Beeck MO, Hustinx R, Maquet P, Salmon E, Moonen G, Luxen A, Laureys S, De Tiège X.(2008) Functional neuroimaging (fMRI, PET and MEG): what do we measure? *Rev Med Liege.* 63(5-6):231-7.
84. Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M.(1983) Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature.* 305(5930):140-2.
85. Gozlan H, Ponchant M, Daval G, Verge D, Menard F, Vanhove A, Beaucourt JP, Hamon M.(1988) 125I-Bolton-Hunter-8-methoxy-2-[N-propyl-N-propylamino]tetralin as a new selective radioligand of 5-HT_{1A} sites in the rat brain. *In vitro* binding and autoradiographic studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 244(2):751-9.
86. Gozlan H, Thibault S, Laporte AM, Lima L, Hamon M. (1995) The selective 5-HT_{1A} antagonist radioligand [3H]WAY 100635 labels both G-protein-coupled and free 5-HT_{1A} receptors in rat brain membranes. *Eur J Pharmacol.* 288(2):173-86.
87. Gross PM (1992) Circumventricular organ capillaries. *Prog Brain Res.* 91 :219-33.
88. Guscott M, Bristow LJ, Hadingham K, Rosahl TW, Beer MS, Stanton JA, Bromidge F, Owens AP, Huscroft I, Myers J, Rupniak NM, Patel S, Whiting PJ, Hutson PH, Fone KC, Biello SM, Kulagowski JJ, McAllister G.(2005) Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT₇ receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology.* 48(4):492-502.
89. Haehner A, Hummel T, Hummel C, Sommer U, Junghanns S, Reichmann H.(2007) Olfactory loss may be a first sign of idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord.* 22(6):839-42.
90. Hagan JJ, Price GW, Jeffrey P, Deeks NJ, Stean T, Piper D, Smith MI, Upton N, Medhurst AD, Middlemiss DN, Riley GJ, Lovell PJ, Bromidge SM, Thomas DR.(2000) Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT(7) receptor antagonist.*Br J Pharmacol.* 130(3):539-48.
91. Halldin C, Gulyás B, Farde L.(2001) PET studies with carbon-11 radioligands in neuropsychopharmacological drug development.*Curr Pharm Des.* 7(18):1907-29.
92. Hall H, Lundkvist C, Halldin C, Farde L, Pike VW, McCarron JA, Fletcher A, Cliffe IA, Barf T, Wikström H, Sedvall G. (1997) Autoradiographic localization of 5-HT_{1A} receptors in the *post-mortem* human brain using [3H]WAY-100635 and [11C]way-100635. *Brain Res.* 745(1-2):96-108.
93. Hall MD, el Mestikawy S, Emerit MB, Pichat L, Hamon M, Gozlan H. (1985) [3H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding to pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain. *J Neurochem.* 44(6):1685-96.
94. Hamon M, Lanfumey L, el Mestikawy S, Boni C, Miquel MC, Bolaños F, Schechter L, Gozlan H.(1990) The main features of central 5-HT₁ receptors. *Neuropsychopharmacology.* 3(5-6):349-60.

95. Hannon J, Hoyer D.(2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res.* 195(1):198-213.
96. Harrigan G.(2002) Metabolic profiling: pathways in drug discovery. *Drug Discov Today.* 7(6):351-2.
97. Hedlund PB, Danielson PE, Thomas EA, Slanina K, Carson MJ, Sutcliffe JG.(2003) No hypothermic response to serotonin in 5-HT7 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(3):1375-80.
98. Hedlund PB, Kelly L, Mazur C, Lovenberg T, Sutcliffe JG, Bonaventure P.(2004) 8-OH-DPAT acts on both 5-HT1A and 5-HT7 receptors to induce hypothermia in rodents. *Eur J Pharmacol.* 487(1-3):125-32.
99. Hedlund PB, Sutcliffe JG.(2004) Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research. *Trends Pharmacol Sci.* 25(9):481-6.
100. Hedlund PB, Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, Sutcliffe JG.(2005) 5-HT7 receptor inhibition and inactivation induce antidepressant-like behavior and sleep pattern. *Biol Psychiatry.* 58(10):831-7.
101. Hedlund PB, Sutcliffe JG.(2007) The 5-HT7 receptor influences stereotypic behavior in a model of obsessive-compulsive disorder. *Neurosci Lett.* 414(3):247-51.
102. Hedlund PB. (2009) The 5-HT7 receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology (Berl).* 206(3):345-54.
103. Hedlund PB, Leopoldo M, Caccia S, Sarkisyan G, Fracasso C, Martelli G, Lacivita E, Berardi F, Perrone R.(2010) LP-211 is a brain penetrant selective agonist for the serotonin 5-HT(7) receptor. *Neurosci Lett.* 481(1):12-6.
104. Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW.(1997) Four 5-hydroxytryptamine7 (5-HT7) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem.* 68(4):1372-81.
105. Heidmann DE, Szot P, Kohen R, Hamblin MW.(1998) Function and distribution of three rat 5-hydroxytryptamine7 (5-HT7) receptor isoforms produced by alternative splicing. *Neuropharmacology.* 37(12):1621-32.
106. Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH.(1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(25):15049-54.
107. Hensler J, Durgam H.(2001) Regulation of 5-HT(1A) receptor-stimulated [35S]-Gtp gammaS binding as measured by quantitative autoradiography following chronic agonist administration. *Br J Pharmacol.* 132(2):605-11.
108. Hensler JG.(2006) Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev.* 30(2):203-14.
109. Herting B, Schulze S, Reichmann H, Haehner A, Hummel T.(2008) A longitudinal study of olfactory function in patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol.* 255(3):367-70.
110. Hornung JP.(2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat.* 26(4):331-43.

111. Houle S, Wilson AA, Inaba T, Fisher N, DaSilva JN.(1997) Imaging 5-HT_{1A} receptors with positron emission tomography: initial human studies with [¹¹C]CPC-222. *Nucl Med Commun.* 18(12):1130-4.
112. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP.(1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev.* 46(2):157-203.
113. Hoyer D, Martin GR.(1996) Classification and nomenclature of 5-HT receptors: a comment on current issues. *Behav Brain Res.* 73(1-2):263-8.
114. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR.(2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(4):533-54.
115. Imai H, Park MR, Steindler DA, Kitai ST. (1986) The morphology and divergent axonal organization of midbrain raphe projection neurons in the rat. *Brain Dev.*8(4):343-54.
116. Ishimura K, Takeuchi Y, Fujiwara K, Tominaga M, Yoshioka H, Sawada T.(1988) Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain. *Neurosci Lett.* 91(3):265-70.
117. Jagust W.(2004) Molecular neuroimaging in Alzheimer's disease. *NeuroRx.* 1(2):206-12.
118. Jasper HH, Ajmon-Marsan C (1954) A stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat. Ottawa : The National Research Council of Canada editors.
119. Jasper JR, Kosaka A, To ZP, Chang DJ, Eglen RM.(1997) Cloning, expression and pharmacology of a truncated splice variant of the human 5-HT₇ receptor (h5-HT_{7b}). *Br J Pharmacol.* 122(1):126-32.
120. Jones BJ, Blackburn TP.(2002) The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(4):555-68.
121. Kaddurah-Daouk R, Kristal BS, Weinshilboum RM. (2008) Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 48:653-83.
122. Kaddurah-Daouk R, Krishnan KR. (2009) Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases. *Neuropsychopharmacology.* 34(1):173-86.
123. Kassir, S.A., Underwood, M.D., Bakalian, M.J., Mann, J.J. and Arango, V. (1998) SOC. *Neurosci. Abstr.* 24, 1274.
124. Kelly RB. (1993) Storage and release of neurotransmitters. *Cell.* 72 Suppl:43-53.
125. Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, Hamon M, Vergé D.(1996) Immunocytochemical localization of serotonin_{1A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 365(2):289-305.
126. Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Vergé D.(1996) Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the rat brain. *J Neurosci Res.* 46(6):697-708.
127. Kikuchi C, Nagaso H, Hiranuma T, Koyama M.(1999) Tetrahydrobenzindoles: selective antagonists of the 5-HT₇ receptor. *J Med Chem.* 42(4):533-5.
128. Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW.(1987) Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science.* 238(4827):650-6.

129. Kobilka B. Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. (1992) *Annu Rev Neurosci.* 15:87-114.
130. Koek W, Vacher B, Cosi C, Assié MB, Patoiseau JF, Pauwels PJ, Colpaert FC. (2001) 5-HT_{1A} receptor activation and antidepressant-like effects: F 13714 has high efficacy and marked antidepressant potential. *Eur J Pharmacol.* 420(2-3):103-12.
131. Köhler C, Steinbusch H. (1982) Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience.* 7(4):951-75.
132. Kojima M, Takeuchi Y, Goto M, Sano Y. (1983) Immunohistochemical study on the distribution of serotonin-containing cell bodies in the brain stem of the dog. *Acta Anat (Basel).* 115(1):8-22.
133. Kosofsky BE, Molliver ME. (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse.* 1(2):153-68.
134. Kumar JS, Mann JJ. (2007) PET tracers for 5-HT_{1A} receptors and uses thereof. *Drug Discov Today.* 12(17-18):748-56.
135. Kumar JS, Prabhakaran J, Majo VJ, Milak MS, Hsiung SC, Tamir H, Simpson NR, Van Heertum RL, Mann JJ, Parsey RV. (2007) Synthesis and *in vivo* evaluation of a novel 5-HT_{1A} receptor agonist radioligand [O-méthyl- ¹¹C]2-(4-(4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)butyl)-4-méthyl-1,2,4-triazine-3,5(2H,4H)dione in nonhuman primates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 34(7):1050-60.
136. Kung MP, Zhuang ZP, Frederick D, Kung HF. (1994) *In vivo* binding of [¹²³I]4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(N-2"-pyridinyl)- p-iodobenzamido-]ethyl-piperazine, p-MPPI, to 5-HT_{1A} receptors in rat brain. *Synapse.* 18(4):359-66.
137. Kusserow H, Davies B, Hörtnagl H, Voigt I, Stroh T, Bert B, Deng DR, Fink H, Veh RW, Theuring F. (2004) Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 129(1-2):104-16.
138. Kristal BS, Shurubor YI. Metabolomics: opening another window into aging. (2005) *Sci Aging Knowledge Environ.* 2005(26):pe19
139. Laćan G, Plenevaux A, Rubins DJ, Way BM, Defraiteur C, Lemaire C, Aerts J, Luxen A, Cherry SR, Melega WP (2008) Cyclosporine, a P-glycoprotein modulator, increases [¹⁸F]MPPF uptake in rat brain and peripheral tissues: microPET and ex vivo studies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 35(12):2256-66.
140. Lanfumey L, Hamon M. (2000) Central 5-HT_{1A} receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol.* 27(5):429-35.
141. Lanfumey L, Hamon M. (2004) 5-HT₁ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3(1):1-10.
142. Lang L, Jagoda E, Schmall B, Vuong BK, Adams HR, Nelson DL, Carson RE, Eckelman WC. (1999) Development of fluorine-18-labeled 5-HT_{1A} antagonists. *J Med Chem.* 42(9):1576-86.

143. Laporte AM, Schechter LE, Bolaños FJ, Vergé D, Hamon M, Gozlan H.(1991) [3H]5-méthyl-urapidil labels 5-HT_{1A} receptors and alpha 1-adrenoceptors in the rat CNS. *In vitro* binding and autoradiographic studies. *Eur J Pharmacol.* 198(1):59-67.
144. Laruelle M, Slifstein M, Huang Y.(2003) Relationships between radiotracer properties and image quality in molecular imaging of the brain with positron emission tomography. *Mol Imaging Biol.* 5(6):363-75.
145. Le Bars D, Lemaire C, Ginovart N, Plenevaux A, Aerts J, Brihaye C, Hassoun W, Leviel V, Mekhsian P, Weissmann D, Pujol JF, Luxen A, Comar D.(1998) High-yield radiosynthesis and preliminary *in vivo* evaluation of p-[18F]MPPF, a fluoro analog of WAY-100635. *Nucl Med Biol.* 25(4):343-50.
146. Lima L, Laporte AM, Gaymard C, Spedding M, Mocaër E, Hamon M. (1997) Atypical *in vitro* and *in vivo* binding of [3H]S-14506 to brain 5-HT_{1A} receptors. *J Neural Transm.* 104(10):1059-75.
147. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, Nicholson JK.(2004) Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers.* 9(1):1-31.
148. Liow JS, Lu S, McCarron JA, Hong J, Musachio JL, Pike VW, Innis RB, Zoghbi SS.(2007) Effect of a P-glycoprotein inhibitor, Cyclosporin A, on the disposition in rodent brain and blood of the 5-HT_{1A} receptor radioligand, [11C](R)-(-)-RWAY. *Synapse.* 61(2):96-105.
149. Lladó-Pelfort L, Assié MB, Newman-Tancredi A, Artigas F, Celada P. (2010) Preferential *in vivo* action of F15599, a novel 5-HT(1A) receptor agonist, at postsynaptic 5-HT(1A) receptors. *Br J Pharmacol.* 160(8):1929-40.
150. López-Rodríguez ML, Porras E, Benhamú B, Ramos JA, Morcillo MJ, Lavandera JL.(2000) First pharmacophoric hypothesis for 5-HT₇ antagonism. *Bioorg Med Chem Lett.* 10(10):1097-100.
151. López-Rodríguez ML, Porras E, Morcillo MJ, Benhamú B, Soto LJ, Lavandera JL, Ramos JA, Olivella M, Campillo M, Pardo L.(2003) Optimization of the pharmacophore model for 5-HT_{7R} antagonism. Design and synthesis of new naphtholactam and naphthosultam derivatives. *J Med Chem.* 46(26):5638-50.
152. Lovell PJ, Bromidge SM, Dabbs S, Duckworth DM, Forbes IT, Jennings AJ, King FD, Middlemiss DN, Rahman SK, Saunders DV, Collin LL, Hagan JJ, Riley GJ, Thomas DR. (2000) A novel, potent, and selective 5-HT(7) antagonist: (R)-3-(2-(2-(4-méthylpiperidin-1-yl)ethyl)pyrrolidine-1-sulfonyl) phenol (SB-269970). *J Med Chem.* 43(3):342-5.
153. Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, Foye PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, et al.(1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron.* 11(3):449-58.
154. Lu S, Liow JS, Zoghbi SS, Hong J, Innis RB, Pike VW.(2010) Evaluation of [C]S14506 and [F]S14506 in rat and monkey as agonist PET radioligands for brain 5-HT(1A) receptors. *Curr Radiopharm.* 3(1):9-18.
155. Lucki I. (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry.* 44(3):151-62.

156. Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ.(2001) Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 155(3):315-22.
157. Ma Y, Lang L, Kiesewetter DO, Eckelman WC.(2002) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry identification of metabolites of three phenylcarboxyl derivatives of the 5-HT(1A) antagonist, N-(2-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl)-N-(2-pyridyl) trans-4-fluorocyclohexanecarboxamide (FCWAY), produced by human and rat hepatocytes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 780(1):99-110.
158. Mahé C, Loetscher E, Feuerbach D, Müller W, Seiler MP, Schoeffter P.(2004) Differential inverse agonist efficacies of SB-258719, SB-258741 and SB-269970 at human recombinant serotonin 5-HT₇ receptors. *Eur J Pharmacol*. 495(2-3):97-102.
159. Maiti DK, Chakraborty PK, Chugani DC, Muzik O, Mangner TJ, Chugani HT. (2005) Synthesis procedure for routine production of [carbonyl-¹¹C]desméthyl-WAY-100635. *Appl Radiat Isot*. 62(5):721-7.
160. Mannoury la Cour C, El Mestikawy S, Hanoun N, Hamon M, Lanfumey L.(2006) Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol*. 70(3):1013-21.
161. Marcinkiewicz M, Vergé D, Gozlan H, Pichat L, Hamon M.(1984) Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT₁ sites in the rat brain. *Brain Res*. 291(1):159-63.
162. Martel JC, Leduc N, Ormière AM, Faucillon V, Danty N, Culie C, Cussac D, Newman-Tancredi A.(2007) WAY-100635 has high selectivity for serotonin 5-HT(1A) versus dopamine D(4) receptors. *Eur J Pharmacol*. 574(1):15-9.
163. Martín-Cora FJ, Pazos A. (2004) Autoradiographic distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain using [³H]mesulergine: comparison to other mammalian species. *Br J Pharmacol*. 141(1):92-104.
164. Martínez-García E, García-Iglesias B, Terrón JA. (2009) Effect of central serotonin depletion on 5-HT receptor-mediated vasomotor responses in the middle meningeal artery of anaesthetized rats. *Auton Autacoid Pharmacol*. 29(1-2):43-50.
165. Maurel JL, Autin JM, Funes P, Newman-Tancredi A, Colpaert F, Vacher B.(2007) High-efficacy 5-HT_{1A} agonists for antidepressant treatment: a renewed opportunity. *J Med Chem*. 50(20):5024-33.
166. McCarron JA, Zoghbi SS, Shetty HU, Vermeulen ES, Wikström HV, Ichise M, Yasuno F, Halldin C, Innis RB, Pike VW.(2007) Synthesis and initial evaluation of [¹¹C](R)-RWAY in monkey-a new, simply labeled antagonist radioligand for imaging brain 5-HT_{1A} receptors with PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 34(10):1670-82.
167. Medina RA, Sallander J, Benhamú B, Porras E, Campillo M, Pardo L, López-Rodríguez ML.(2009) Synthesis of new serotonin 5-HT₇ receptor ligands. Determinants of 5-HT₇/5-HT_{1A} receptor selectivity. *J Med Chem*. 52(8):2384-92.
168. Meneses A, Perez-Garcia G.(2007) 5-HT(1A) receptors and memory. *Neurosci Biobehav Rev*. 31(5):705-27.
169. Meyerhof W, Obermüller F, Fehr S, Richter D.(1993) A novel rat serotonin receptor: primary structure, pharmacology, and expression pattern in distinct brain regions. *DNA Cell Biol*. 12(5):401-9.

170. Middlemiss DN, Fozard JR.(1983) 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *Eur J Pharmacol.* 90(1):151-3.
171. Miquel MC, Emerit MB, Gozlan H, Hamon M.(1991) Involvement of tryptophan residue(s) in the specific binding of agonists/antagonists to 5-HT₃ receptors in NG108-15 clonal cells. *Biochem Pharmacol.* 42(7):1453-61.
172. Milak MS, Severance AJ, Ogden RT, Prabhakaran J, Kumar JS, Majo VJ, Mann JJ, Parsey RV.(2008) Modeling considerations for ¹¹C-CUMI-101, an agonist radiotracer for imaging serotonin 1A receptor *in vivo* with PET. *J Nucl Med.* 49(4):587-96.
173. Milak MS, Severance AJ, Prabhakaran J, Kumar JS, Majo VJ, Ogden RT, Mann JJ, Parsey RV.(2010) *In vivo* serotonin-sensitive binding of [(11)C]CUMI-101: a serotonin 1A receptor agonist positron emission tomography radiotracer.*J Cereb Blood Flow Metab.*
174. Milligan G, Kellett E, Dacquet C, Dubreuil V, Jacoby E, Millan MJ, Lavielle G, Spedding M. (2001) S 14506: novel receptor coupling at 5-HT(1A) receptors. *Neuropharmacology.* 40(3):334-44.
175. Mintzer JE, Tune LE, Breder CD, Swanink R, Marcus RN, McQuade RD, Forbes A. (2007) Aripiprazole for the treatment of psychoses in institutionalized patients with Alzheimer dementia: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled assessment of three fixed doses. *Am J Geriatr Psychiatry.*15(11):918-31.
176. Mochizuki H, Amano T, Seki T, Matsubayashi H, Mitsuhata C, Morita K, Kitayama S, Dohi T, Mishima HK, Sakai N.(2005) Role of C-terminal region in the functional regulation of rat serotonin transporter (SERT).*Neurochem Int.* 46(2):93-105.
177. Moir AT.(1971) Interaction in the cerebral metabolism of the biogenic amines: effect of intravenous infusion of L-tryptophan on the metabolism of dopamine and 5-hydroxyindoles in brain and cerebrospinal fluid.*Br J Pharmacol.* 43(4):715-23.
178. Molliver ME.(1987) Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function.*J Clin Psychopharmacol.* 7(6 Suppl):3S-23S.
179. Monsma FJ Jr, Shen Y, Ward RP, Hamblin MW, Sibley DR.(1993) Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs. *Mol Pharmacol.* 43(3):320-7.
180. Mullins UL, Gianutsos G, Eison AS.(1999) Effects of antidepressants on 5-HT₇ receptor regulation in the rat hypothalamus. *Neuropsychopharmacology.* 21(3):352-67.
181. Murphy, D.L. et al. (2004) Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Molecular Interventions*, 4(2), 109-123.
182. Nalivaiko E, Sgoifo A.(2009) Central 5-HT receptors in cardiovascular control during stress. *Neurosci Biobehav Rev.* 33(2):95-106.
183. Njus D, Kelley PM, Harnadek GJ.(1986) Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 853(3-4):237-65.
184. Nénonéné EK, Radja F, Carli M, Grondin L, Reader TA.(1994) Heterogeneity of cortical and hippocampal 5-HT_{1A} receptors: a reappraisal of homogenate binding with 8-[³H]hydroxydipropylaminotetralin. *J Neurochem.* 62(5):1822-34.
185. Neumaier JF, Sexton TJ, Yracheta J, Diaz AM, Brownfield M.(2001) Localization of 5-HT(7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, *in situ* hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *J Chem Neuroanat.* 21(1):63-73.

186. Newman-Tancredi A, Martel JC, Assié MB, Buritova J, Lauressergues E, Cosi C, Heusler P, Bruins Slot L, Colpaert FC, Vacher B, Cussac D.(2009) Signal transduction and functional selectivity of F15599, a preferential post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist. *Br J Pharmacol.* 156(2):338-53.
187. Newman-Tancredi A. (2010) The importance of 5-HT_{1A} receptor agonism in antipsychotic drug action: rationale and perspectives. *Curr Opin Investig Drugs.* 11(7):802-12.
188. Palczewski K, Sokal I, Baehr W.(2004) Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity. *Biochem Biophys Res Commun.* 322(4):1123-30.
189. Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M.(1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(18):10734-9.
190. Passchier J, van Waarde A, Doze P, Elsinga PH, Vaalburg W. (2000) Influence of P-glycoprotein on brain uptake of [¹⁸F]MPPF in rats. *Eur J Pharmacol.* 407(3):273-80.
191. Patel S, Gibson R. (2008) *In vivo* site-directed radiotracer: a mini-review. *Nucl Med Biol.* 35:805-15.
192. Paterson LM, Tyacke RJ, Nutt DJ and Knudsen GM (2010) Measuring endogenous 5-HT release by emission tomography : promises and pitfalls. *J Cereb Blood Flow and Metab* (2010) 1-25
193. Pauwels PJ, Colpaert FC.(2003) Ca²⁺ responses in Chinese hamster ovary-K1 cells demonstrate an atypical pattern of ligand-induced 5-HT_{1A} receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 307(2):608-14.
194. Paxinos G, Watson C (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates, second ed. Academic Press, New York.
195. Pedigo NW, Yamamura HI, Nelson DL.(1981) Discrimination of multiple [³H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem.* 36(1):220-6.
196. Pejchal T, Foley MA, Kosofsky BE, Waeber C. (2002) Chronic fluoxetine treatment selectively uncouples raphe 5-HT_{1A} receptors as measured by [(35)S]-GTPγS autoradiography. *Br J Pharmacol.* 135(5):1115-22.
197. Peroutka SJ, Snyder SH.(1979) Multiple serotonin receptors: differential binding of [³H]5-hydroxytryptamine, [³H]lysergic acid diethylamide and [³H]spiroperidol. *Mol Pharmacol.* 16(3):687-99.
198. Pike VW, Halldin C, McCarron JA, Lundkvist C, Hirani E, Olsson H, Hume SP, Karlsson P, Osman S, Swahn CG, Hall H, Wikström H, Menonidas M, Poole KG, Farde L.(1998) [carbonyl-¹¹C]Desméthyl-WAY-100635 (DWAY) is a potent and selective radioligand for central 5-HT_{1A} receptors *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Nucl Med.* 25(4):338-46.
199. Pike VW, Halldin C, Wikström HV.(2001) Radioligands for the study of brain 5-HT_{1A} receptors *in vivo*. *Prog Med Chem.* 38:189-247.
200. Pike VW. (2009) PET radiotracers: crossing the blood-brain barrier and surviving metabolism. *Trends Pharmacol Sci.* 30(8):431-40.

201. Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G.(1992) Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci.* 12(2):440-53.
202. Plassat JL, Amlaiky N, Hen R. (1993) Molecular cloning of a mammalian serotonin receptor that activates adenylate cyclase. *Mol Pharmacol.* 44(2):229-36.
203. Prabhakaran J, Parsey RV, Majo VJ, Hsiung SC, Milak MS, Tamir H, Simpson NR, Van Heertum RL, Mann JJ, Dileep Kumar JS.(2006) Synthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation of [O-méthyl-¹¹C] 2-{4-[4-(3-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-butyl}-4-méthyl-2H-[1,2,4]-triazine-3,5-dione: a novel agonist 5-HT_{1A} receptor PET ligand. *Bioorg Med Chem Lett.* 16(8):2101-4.
204. Quinones MP, Kaddurah-Daouk R.(2009) Metabolomics tools for identifying biomarkers for neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis.* 35(2):165-76.
205. Raje S, Patat AA, Parks V, Schechter L, Plotka A, Paul J, Langstrom B. (2008) A positron emission tomography study to assess binding of lecozotan, a novel 5-hydroxytryptamine-1A silent antagonist, to brain 5-HT_{1A} receptors in healthy young and elderly subjects, and in patients with Alzheimer's disease. *Clin Pharmacol Ther.* 83(1):86-96.
206. Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R.(1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(24):14476-81.
207. Riad M, Watkins KC, Doucet E, Hamon M, Descarries L. (2001) Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci.* 1;21(21):8378-86.
208. Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Beck SG, Hen R, Leonardo ED.(2010) 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron.* 65(1):40-52.
209. Ruat M, Traiffort E, Arrang JM, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Leurs R, Schwartz JC.(1993) A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 193(1):268-76.
210. Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC.(1993) Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(18):8547-51.
211. Saigal N, Pichika R, Easwaramoorthy B, Collins D, Christian BT, Shi B, Narayanan TK, Potkin SG, Mukherjee J.(2006) Synthesis and biologic evaluation of a novel serotonin 5-HT_{1A} receptor radioligand, ¹⁸F-labeled mefway, in rodents and imaging by PET in a nonhuman primate. *J Nucl Med.* 47(10):1697-706.
212. Sandell J, Halldin C, Hall H, Thorberg SO, Werner T, Sohn D, Sedvall G, Farde L. (1999) Radiosynthesis and autoradiographic evaluation of [¹¹C]NAD-299, a radioligand for visualization of the 5-HT_{1A} receptor. *Nucl Med Biol.* 26(2):159-64.
213. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.* 301(5634):805-9.

214. Sato S, Mizukami K, Asada T (2007) A preliminary open-label study of 5-HT_{1A} partial agonist tandospirone for behavioural and psychological symptoms associated with dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 10 :281-3
215. Schechter LE, Smith DL, Rosenzweig-Lipson S, Sukoff SJ, Dawson LA, Marquis K, Jones D, Piesla M, Andree T, Nawoschik S, Harder JA, Womack MD, Buccafusco J, Terry AV, Hoebel B, Rada P, Kelly M, Abou-Gharbia M, Barrett JE, Childers W. (2005) Lecozotan (SRA-333): a selective serotonin 1A receptor antagonist that enhances the stimulated release of glutamate and acetylcholine in the hippocampus and possesses cognitive-enhancing properties. *J Pharmacol Exp Ther.* 314(3):1274-89.
216. Schreiber G, Avissar S. (2007) Regulators of G-protein-coupled receptor-G-protein coupling: antidepressants mechanism of action. *Expert Rev Neurother.* 7(1):75-84.
217. Sempere Roldan P, Chereul E, Dietzel O, Magnier L, Pautrota C, Rbah L, Sappey-Marinier D, Wagner A, Zimmer L, Janier M, Tarazona V, et Dietzel G. (2007) Raytest ClearPET, a new generation small animal PET scanner. *Nucl Instr Meth Phys Res A*, 498-501
218. Shen Y, Monsma FJ Jr, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW, Sibley DR. (1993) Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem.* 268(24):18200-4.
219. Shiue CY, Shiue GG, Mozley PD, Kung MP, Zhuang ZP, Kim HJ, Kung HF.(1997) P-[18F]-MPPF: a potential radioligand for PET studies of 5-HT_{1A} receptors in humans. *Synapse.* 25(2):147-54.
220. Shimokawa A, Kunitake T, Takasaki M, Kannan H. (1998) Differential effects of anesthetics on sympathetic nerve activity and arterial baroreceptor reflex in chronically instrumented rats. *J Auton Nerv Syst.* 72(1):46-54.
221. Sleight AJ, Carolo C, Petit N, Zwingelstein C, Bourson A.(1995) Identification of 5-hydroxytryptamine₇ receptor binding sites in rat hypothalamus: sensitivity to chronic antidepressant treatment. *Mol Pharmacol.* 47(1):99-103.
222. Snider RS, Niemer WT (1961) A stereotaxic atlas of a cat brain. Chicago : University of Chicago Press.
223. Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M.(1990) Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci.* 2(12):1144-1154.
224. Sprouse J, Reynolds L, Li X, Braselton J, Schmidt A.(2004) 8-OH-DPAT as a 5-HT₇ agonist: phase shifts of the circadian biological clock through increases in cAMP production. *Neuropharmacology.* 46(1):52-62.
225. Starke, K., Taube, H.D. et Borowski, E. (1977) Pre- and postsynaptic receptors in catecholaminergic transmission. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 297 Suppl 1, S43-44.
226. Steinbusch HW. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience.* 6(4):557-618.
227. Steinbusch HW, Nieuwenhuys R.(1981) Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special references to the innervation of the hypothalamus. *Adv Exp Med Biol.* 133:7-35.

228. Stowe RL, Barnes NM.(1998) Selective labelling of 5-HT₇ receptor recognition sites in rat brain using [3H]5-carboxamidotryptamine. *Neuropharmacology*. 37(12):1611-1619
229. Suehiro M, Underwood M, Arango V, Wang TS, Kassir S, Bakalian M, Yatabe T, Pratap M, Van Heertum RL, Mann JJ.(1998) *In vivo* biodistribution of a radiotracer for imaging serotonin-1A receptor sites with PET:[11C]LY274601. *Life Sci*. 63(17):1533-42.
230. Sumiyoshi T, Bubenikova-Valesova V, Horacek J, Bert B. (2008) Serotonin_{1A} receptors in the pathophysiology of schizophrenia : development of novel cognition-enhancing therapeutics. *Adv Ther*. 25(10) :1037-56
231. Taber E, Brodal A, Walberg F. (1960) The raphe nuclei of the brain stem in the cat. I. Normal topography and cytoarchitecture and general discussion. *J Comp Neurol*. 114:161-87.
232. Terrón JA, Martínez-García E.(2007) 5-HT₇ receptor-mediated dilatation in the middle meningeal artery of anesthetized rats. *Eur J Pharmacol*. 560(1):56-60.
233. Thomas DR, Middlemiss DN, Taylor SG, Nelson P, Brown AM.(1999) 5-CT stimulation of adenylyl cyclase activity in guinea-pig hippocampus: evidence for involvement of 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol*.128(1):158-64.
234. Thomas DR, Atkinson PJ, Ho M, Bromidge SM, Lovell PJ, Villani AJ, Hagan JJ, Middlemiss DN, Price GW.(2000) [(3)H]-SB-269970-A selective antagonist radioligand for 5-HT(7) receptors. *Br J Pharmacol*. 130(2):409-17.
235. Thomas DR, Atkinson PJ, Hastie PG, Roberts JC, Middlemiss DN, Price GW. (2002) [3H]-SB-269970 radiolabels 5-HT₇ receptors in rodent, pig and primate brain tissues. *Neuropharmacology*. 42(1):74-81.
236. Thomas DR, Melotto S, Massagrande M, Gribble AD, Jeffrey P, Stevens AJ, Deeks NJ, Eddershaw PJ, Fenwick SH, Riley G, Stean T, Scott CM, Hill MJ, Middlemiss DN, Hagan JJ, Price GW, Forbes IT.(2003) SB-656104-A, a novel selective 5-HT₇ receptor antagonist, modulates REM sleep in rats. *Br J Pharmacol*. 139(4):705-14.
237. Thomas DR, Hagan JJ.(2004) 5-HT₇ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 3(1):81-90.
238. Tohyama Y, Takahashi S, Merid MF, Watanabe A, Diksic M. (2002) The inhibition of tryptophan hydroxylase, not protein synthesis, reduces the brain trapping of alpha-méthyl-L-tryptophan: an autoradiographic study. *Neurochem Int*. 40(7):603-10.
239. Törk I.(1990) Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci*. 600:9-34; discussion 34-5.
240. Tsou AP, Kosaka A, Bach C, Zuppan P, Yee C, Tom L, Alvarez R, Ramsey S, Bonhaus DW, Stefanich E, et al. (1994) Cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ receptor positively coupled to adenylyl cyclase. *J Neurochem*. 63(2):456-64.
241. Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Lübbert H. (1995) Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett*. 370(3):215-21.
242. Vacher B, Bonnaud B, Funes P, Jubault N, Koek W, Assié MB, Cosi C.(1998) Design and synthesis of a series of 6-substituted-2-pyridinylméthylamine derivatives as novel, high-affinity, selective agonists at 5-HT_{1A} receptors. *J Med Chem*. 41(25):5070-83.

243. Vacher B, Bonnaud B, Funes P, Jubault N, Koek W, Assié MB, Cusi C, et Kleven M.(1999) Novel Derivatives of 2-Pyridineméthylamine as Selective, Potent, and Orally Active Agonists at 5-HT_{1A} Receptors. *J Med Chem.* 42 (9), 1648-1660
244. Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE.(2000) 5-HT₇ receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol Sci.* 21(2):70-7.
245. Varnäs K, Thomas DR, Tupala E, Tiihonen J, Hall H.(2004) Distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain: a preliminary autoradiographic study using [³H]SB-269970. *Neurosci Lett.* 367(3):313-6.
246. Vasan RS. (2006) Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 113: 2335-2362.
247. Villalón CM, Heiligers JP, Centurión D, De Vries P, Saxena PR.(1997) Characterization of putative 5-HT₇ receptors mediating tachycardia in the cat. *Br J Pharmacol.* 121(6):1187-95.
248. Volk B, Barkóczy J, Hegedus E, Udvari S, Gacsályi I, Mezei T, Pallagi K, Kompagne H, Lévy G, Egyed A, Hársing LG Jr, Spedding M, Simig G. (2008) (Phenylpiperazinyl-butyl)oxindoles as selective 5-HT₇ receptor antagonists. *J Med Chem.* 51(8):2522-32.
249. Walther DJ, Bader M. (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol.* 66(9):1673-80.
250. Warembourg M, Poulain P.(1985) Localization of serotonin in the hypothalamus and the mesencephalon of the guinea-pig. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res.* 240(3):711-21.
251. Watabe H, Ikoma Y, Kimura Y, Naganawa M, Shidahara M.(2006) PET kinetic analysis--compartmental model. *Ann Nucl Med.* 20(9):583-8.
252. Waterhouse RN.(2003) Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Mol Imaging Biol.* 5(6):376-89.
253. Wesółowska A, Tatarczyńska E, Nikiforuk A, Chojnacka-Wójcik E.(2007) Enhancement of the anti-immobility action of antidepressants by a selective 5-HT₇ receptor antagonist in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol.* 555(1):43-7.
254. Wesółowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K.(2006) Potential anxiolytic and antidepressant effects of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 after intrahippocampal administration to rats. *Eur J Pharmacol.* 553(1-3):185-90.
255. Wesółowska A, Nikiforuk A, Stachowicz K, Tatarczyńska E.(2006) Effect of the selective 5-HT₇ receptor antagonist SB 269970 in animal models of anxiety and depression. *Neuropharmacology.* 51(3):578-86.
256. Wedzony K, Maćkowiak M, Czyrak A, Fijał K, Michalska B.(1997) Single doses of MK-801, a non-competitive antagonist of NMDA receptors, increase the number of 5-HT_{1A} serotonin receptors in the rat brain. *Brain Res.* 756(1-2):84-91.
257. Weinberger DR, Egan MF, Bertolino A, Callicott JH, Mattay VS, Lipska BK, Berman KF, Goldberg TE.(2001) Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 50(11):825-44.
258. Wiklund L, Björklund A.(1980) Mechanisms of regrowth in the bulbospinal serotonin system following 5,6-dihydroxytryptamine induced axotomy. II. Fluorescence histochemical observations. *Brain Res.* 191(1):109-27.

259. Wiklund L, Léger L, Persson M. (1981) Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and locus coeruleus cell groups. *J Comp Neurol.* 203(4):613-47.
260. Wilson AA, Inaba T, Fischer N, Dixon LM, Nobrega J, DaSilva JN, Houle S.(1998) Derivatives of WAY 100635 as potential imaging agents for 5-HT_{1A} receptors: syntheses, radiosyntheses, and *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Nucl Med Biol.*;25(8):769-76.
261. Winblad B, Bucht G, Gottfries CG, Roos BE. (1979) Monoamines and monoamine metabolites in brains from demented schizophrenics. *Acta Psychiatr Scand.* 60(1):17-28.
262. Yasuno F, Zoghbi SS, McCarron JA, Hong J, Ichise M, Brown AK, Gladding RL, Bacher JD, Pike VW, Innis RB.(2006) Quantification of serotonin 5-HT_{1A} receptors in monkey brain with [¹¹C](R)-(-)-RWAY. *Synapse.* 60(7):510-20.
263. Zhang MR, Haradahira T, Maeda J, Okauchi T, Kida T, Obayashi S, Suzuki K et Suhara T. (2002) Synthesis and preliminary PET study of the 5-HT₇ receptor antagonist [¹¹C]DR4446. *J Label Compd Radiopharm* 45: 857-866.
264. Zhang XY, Yasuno F, Zoghbi SS, Liow JS, Hong J, McCarron JA, Pike VW, Innis RB.(2007) Quantification of serotonin 5-HT_{1A} receptors in humans with [¹¹C](R)-(-)-RWAY: radiometabolite(s) likely confound brain measurements. *Synapse.* 61(7):469-77.
265. Zhuang ZP, Kung MP, Kung HF.(1993) Synthesis of (R,S)-trans-8-hydroxy-2-[N-n-propyl-N-(3'-iodo-2'-propenyl)amino]tetral in (trans-8-OH-PIPAT): a new 5-HT_{1A} receptor ligand. *J Med Chem.* 36(21):3161-5.
266. Zhuang ZP, Kung MP, Chumpradit S, Mu M, Kung HF. (1994) Derivatives of 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(N-2"-pyridinyl-p-iodobenzamido)ethyl]piperazine (p-MPPI) as 5-HT_{1A} ligands. *J Med Chem.* 37:4572-5.
267. Zimmer L, Luxen A, Giacomelli F, Pujol JF.(2002) Short- and long-term effects of p-ethynylphenylalanine on brain serotonin levels. *Neurochem Res.* 27(4):269-75.
268. Zimmer L, Fournet G, Benoît J, Guillaumet G, Le Bars D.(2003) Carbon-11 labelling of 8[[3-[4-(2-[(¹¹C)methoxyphenyl]piperazin-1-yl]-2-hydroxypropyl]oxy]thiochroman, a presynaptic 5-HT(1A) receptor agonist, and its *in vivo* evaluation in anaesthetised rat and in awake cat. *Nucl Med Biol.* 30(5):541-6.

TITLE

Contributions of PET in molecular imaging of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ serotonin receptors

SUMMARY

The serotonergic system, implicated in several diseases of central nervous system, can be explored in vivo by PET imaging (positron emission tomography). The research and the preclinical validation of radiotracers that specifically target serotonin are crucial. In this work, we focused on two serotonin receptors for which we have developed molecular tools for functional imaging: (i) the 5-HT_{1A} and (ii) the 5-HT₇.

(i) 5-HT_{1A} receptors are among the serotonin receptors the best described at present. However, if PET radiotracers are already available, they are antagonists and bind either to 5-HT_{1A} receptors, G protein-coupled and functional, and to 5-HT_{1A} receptors decoupled and non-functional. We therefore proposed an original strategy to develop a 5-HT_{1A} agonist labeled with fluorine to access imagery of functional receptors. Two molecules, the F15599 and F13714, initially developed for their antidepressant properties by an industrial partner, were radiolabeled with fluorine-18 and were evaluated in vitro, ex vivo and in vivo in rats and cats. Our results show that the [¹⁸F] F13714 may view in a new way the 5-HT_{1A} G protein-coupled

(ii) The second focus of this thesis for the 5-HT₇, recently discovered and proposed as a therapeutic target antidepressant. Unlike the 5-HT_{1A}, 5-HT₇ receptors do not yet have PET radiotracer. Our approach was to select, from the pharmacophore of the receptor, four structures of 5-HT₇ antagonists, synthesized by a lab partner in chemistry: the 2FP3, the 4FP3, the 2FPMP and 4FPMP. Our radiopharmacology in vitro, ex vivo and in vivo led us to retain a radiotracer, the [¹⁸F] 2FP3.

At the conclusion of this thesis CIFRE, we can propose two originals PET radiotracers , opening new perspectives for molecular imaging of neurotransmission of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors and which we plan further development as clinical radiopharmaceuticals.

DISCIPLINE

Neurosciences

KEYWORDS

Sérotonine, 5-HT_{1A}, 5-HT₇, TEP

TITLE AND ADRESSE OF LABORATORIE

Center for Research in Neurosciences de Lyon (CNRS UMR5292-INSERM U1028)
Team "Radiopharmaceuticals and neurochemical biomarkers" (Prof. Zimmer)
CERMEP, Groupement Hospitalier Est, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron.

TITRE

Apports de la TEP dans l'imagerie moléculaire des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1A} et 5-HT₇

RESUME

Le système sérotoninergique, impliqué dans plusieurs pathologies du système nerveux central, peut être exploré *in vivo* par l'imagerie TEP (tomographie par émission de positons). La recherche et la validation préclinique de radiotraceurs ciblant spécifiquement les récepteurs sérotoninergiques est donc cruciale. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux récepteurs sérotoninergiques pour lesquels nous avons développé des outils moléculaires pour leur imagerie fonctionnelle: (i) les récepteurs 5-HT_{1A} et (ii) les récepteurs 5-HT₇.

(i) Les récepteurs 5-HT_{1A} sont parmi les récepteurs à sérotonine les mieux décrits à l'heure actuelle. Cependant, si des radiotraceurs TEP sont déjà disponibles, ceux-ci sont des antagonistes qui se fixent indifféremment aux récepteurs 5-HT_{1A}, couplés aux protéines G et fonctionnels, et aux récepteurs 5-HT_{1A}, découplés et non fonctionnels. Nous avons donc proposé une stratégie originale de développement d'un agoniste 5-HT_{1A} radiomarqué au fluor afin d'accéder à une imagerie des récepteurs fonctionnels. Deux molécules, le F15599 et le F13714, initialement développées pour leurs propriétés antidépressives par un partenaire industriel, ont été radiomarquées au fluor 18 puis ont été évaluées *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* chez le rat et le chat. Nos résultats montrent que le [¹⁸F]F13714 permet de visualiser de manière inédite les récepteurs 5-HT_{1A} couplés aux protéines G.

(ii) Le deuxième axe de cette thèse concerne les récepteurs 5-HT₇, de découverte récente et proposés comme cible thérapeutique antidépressive. A l'inverse des récepteurs 5-HT_{1A}, les récepteurs 5-HT₇ ne disposent pas encore de radiotraceur TEP. Notre approche a consisté à sélectionner, à partir du pharmacophore du récepteur, quatre structures d'antagonistes 5-HT₇, synthétisées par un laboratoire partenaire de chimie : le 2FP3, le 4FP3, le 2FPMP et le 4FPMP. Nos études radiopharmacologiques *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* nous ont conduit à retenir un radiotraceur, le [¹⁸F]2FP3.

À l'issue de ce travail de thèse CIFRE, nous pouvons donc proposer deux radiotraceurs TEP originaux, ouvrant des perspectives inédites d'imagerie moléculaires de la neurotransmission 5-HT_{1A} et 5-HT₇ et dont nous envisageons la poursuite du développement comme radiopharmaceutiques cliniques.

DISCIPLINE

Neurosciences

MOTS-CLES

Sérotonine, 5-HT_{1A}, 5-HT₇, TEP

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CNRS UMR5292- INSERM U1028)
Équipe « Biomarqueurs radiopharmaceutiques et neurochimiques » (Pr. Zimmer)
CERMEP-Imagerie du Vivant, Groupement Hospitalier Est, 59 bd Pinel, 69677 Bron.